

PCT/JP 2004/012424

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

23.08.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 8 月 2 1 日

REC'D 07 OCT 2004

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 2 9 7 9 1 3  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 2 9 7 9 1 3 ]

WIPO PCT

出 願 人  
Applicant(s): 株式会社ロコモジェン

BEST AVAILABLE COPY

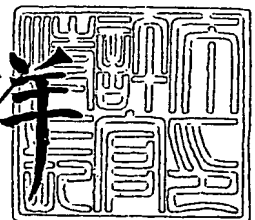
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 9 月 2 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川

洋



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 8 5 8 0 7

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03-0115  
【提出日】 平成15年 8月21日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区中川 1-2-5 港北ガーデンヒルズ A棟  
                            503号  
    【氏名】 中島 利博  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区寺尾台 1-21-16 大滝ハイツ 201  
                            号  
    【氏名】 天野 徹也  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区長沢 1-34-18 トウワコテ長沢 30  
                            6号室  
    【氏名】 土持 兼之  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区新石川 2-16-7 石川坂マンション 3  
                            05号  
    【氏名】 山崎 聡士  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市港南区日野中央 2-39-9 コスモ港南台 50  
                            7号  
    【氏名】 八木下 尚子  
【特許出願人】  
    【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門 4-1-1 虎ノ門パストラル本館 7階  
    【氏名又は名称】 株式会社ロコモジェン  
【代理人】  
    【識別番号】 100092783  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小林 浩  
    【電話番号】 03-3273-2611  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100095360  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 片山 英二  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100093676  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小林 純子  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100120134  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 大森 規雄  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 157061  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1

|       |       |
|-------|-------|
| 【物件名】 | 明細書 1 |
| 【物件名】 | 図面 1  |
| 【物件名】 | 要約書 1 |

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 2120～2130 番目の塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。

**【請求項 2】**

配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 1～2201 番目、969～2201 番目、1142～2201 番目、1699～2201 番目、1880～2201 番目、2002～2201 番目、2094～2201 番目及び 2118～2201 番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。

**【請求項 3】**

配列番号 1 に示す塩基配列のうち少なくとも 1～3043 番目、969～3043 番目、1142～3043 番目、1699～3043 番目、1880～3043 番目、2002～3043 番目、2094～3043 番目及び 2118～3043 番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。

**【請求項 4】**

配列番号 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 1～3092 番目、969～3092 番目、1142～3092 番目、1699～3092 番目、1880～3092 番目、2002～3092 番目、2094～3092 番目及び 2118～3092 番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。

**【請求項 5】**

以下の (a) 又は (b) のプロモーター。

(a) 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のプロモーターの塩基配列の一部の領域に欠失、置換若しくは挿入が生じ、かつ、プロモーター活性を有する塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター

(b) 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のプロモーターの塩基配列に相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロモーター活性を有する塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター

**【請求項 6】**

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のプロモーター、発現の目的遺伝子及びターミネーターを含む遺伝子発現カセット。

**【請求項 7】**

請求項 6 記載の遺伝子発現カセットを含む組換えベクター。

**【請求項 8】**

請求項 7 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

**【請求項 9】**

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のプロモーターの活性を阻害又は促進することを特徴とする、転写活性調節方法。

**【請求項 10】**

プロモーターの活性の阻害又は促進が、転写因子の結合活性を阻害又は促進するものである請求項 9 記載の方法。

**【請求項 11】**

転写因子の結合部位が Ets 結合部位である請求項 10 記載の方法。

**【請求項 12】**

転写因子が、GABP  $\alpha$ 、GABP  $\beta$ 、GABP  $\alpha$  と GABP  $\beta$  との複合体、Ets1、Pea3、Tel 及び Fli-1 からなる群から選ばれるいずれかのものである請求項 10 又は 11 記載の方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】シノビオリン遺伝子のプロモーター

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、シノビオリン遺伝子のプロモーターに関する。

## 【背景技術】

【0002】

シノビオリン (Synoviolin) は、関節リウマチ患者の滑膜細胞ライブラリーから、抗滑膜細胞抗体を用いた免疫スクリーニングによりクローニングされたタンパク質である。

【0003】

シノビオリンは、RING フィンガードメインを有するユビキチンリガーゼ (E3) であり、小胞体における品質管理を担う機能を有する。そして、シノビオリン (シノビオリン遺伝子) のアミノ酸配列 (塩基配列) は、酵母Hrd1と高い相同性を有し、酵母Hrd1のヒトホモログとしてクローニングしたヒトhrd1と同じ分子であることが判明した (Kaneko, FEBS Lett. Dec 4;532(1-2):147-52, 2002)。

【0004】

上記小胞体の品質管理を担うために、現在までに以下の3つの機構が知られている。1つは、PERK (小胞体係留蛋白質) による機構である。この機構は、翻訳開始因子であるeIFをリン酸化することにより、翻訳を抑制し、ERストレス (後述) を軽減するというものである。2つ目は、ATF6、IRE-1等のERストレスを感知する小胞体膜タンパクによるATF6、XBP1の転写因子を介した転写調節機構である。この機構によれば、ATF6、XBP1は、Bip等のシャペロン分子の転写を誘導し、不良タンパク質の再折りたたみ反応を促進する。この反応は、UPR (unfolded protein response) と呼ばれている。3つ目は、不良タンパク質を分解し、ERストレスを軽減させるERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) である (Kaufman RJ, Nat Rev Mol Cell Biol Jun;3(6):411-21, 2002: 非特許文献1)。このERADについて詳述すると以下の通りである。

【0005】

すなわち、タンパク質は、細胞質で合成された後、正しい立体構造を形成して所定の場所に運ばれて初めて機能することができる。適切な高次構造がとれなかった不良又は損傷タンパク質は、細胞のもつ品質管理機能によりチェックを受けて、再生又は分解されて、細胞機能の恒常性を保つ。

【0006】

小胞体内腔における生合成途中のタンパク質は不安定であるため、種々の物理化学的ストレス (例えば虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、遺伝子変異等) に曝される。このようなストレスを小胞体ストレス (ERストレス) と呼び、小胞体内に異常な折りたたみ構造を持つタンパク質 (unfolded protein) の出現頻度を上昇させる。立体構造に異常を来たした不良タンパク質は小胞体を出てゴルジ体に輸送されないため、そのままでは小胞体内に不良タンパク質が蓄積されてしまう。そこで、これらのERストレスに対して、細胞はUPR及びERADと呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって、不良タンパク質を分解し、そのような不良タンパク質が蓄積することによる小胞体のストレスを防ぐのである。シノビオリンは、この3つ目の機構であるERADに関与し、ERストレスにより誘導される (Kaneko FEBS Lett. Dec 4;532(1-2):147-52, 2002: 非特許文献2)。

【0007】

一方、本発明者は、シノビオリンの発現増加が、ERADを亢進させることにより、ERストレスによるアポトーシスの感受性を低下させ、その発現低下によりアポトーシスの感受性が増加することを証明した。

【0008】

また、リウマチ滑膜細胞において、正常滑膜に比較しその発現が増加していることも確認している。そこで、関節炎におけるシノビオリンの意義を確かめるため、ヘテロノックアウトマウスにCIA (collagen induced arthritis; コラーゲン誘導関節炎。ウシII型コ

ラーゲンを皮内注射し、免疫させ、産生された抗体にて関節炎を発症させるマウスモデル)を誘導した。その結果、シノビオリンの発現を半分にすることでER ストレスに対するアポトーシス感受性が野生型マウスに比べ減少し、CIAに抵抗性をもつことを証明した。このことから、その発現の要求性には、細胞、組織特異性があることが考えられた。

【0009】

以上の知見より、シノビオリンの量の調節機構は、細胞のER ストレスに対するアポトーシス感受性を担っていることから、その機構の解明は大変重要である。

【非特許文献1】Kaufman RJ, Nat Rev Mol Cell Biol Jun; 3(6): 411-21, 2002

【非特許文献2】Kaneko FEBS Lett. Dec 4; 532(1-2): 147-52, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、シノビオリン遺伝子のプロモーターを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、シノビオリンのプロモーター領域を切断して種々の長さを有する断片についてプロモーター活性を調べた結果、そのコア領域を特定し、転写因子との相互作用を解明することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち、本発明は以下の通りである。

【0013】

(1) 配列番号1又は2に示す塩基配列のうち少なくとも2120～2130番目の塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。

【0014】

(2) 配列番号1又は2に示す塩基配列のうち少なくとも1～2201番目、969～2201番目、1142～2201番目、1699～2201番目、1880～2201番目、2002～2201番目、2094～2201番目及び2118～2201番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。

【0015】

(3) 配列番号1に示す塩基配列のうち少なくとも1～3043番目、969～3043番目、1142～3043番目、1699～3043番目、1880～3043番目、2002～3043番目、2094～3043番目及び2118～3043番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。

【0016】

(4) 配列番号2に示す塩基配列のうち少なくとも1～3092番目、969～3092番目、1142～3092番目、1699～3092番目、1880～3092番目、2002～3092番目、2094～3092番目及び2118～3092番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。

【0017】

(5) 以下の(a)又は(b)のプロモーター。

【0018】

(a) 上記(1)～(4)のいずれか1項に記載のプロモーターの塩基配列の一部の領域に欠失、置換若しくは挿入が生じ、かつプロモーター活性を有する塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター

(b) 上記(1)～(4)のいずれか1項に記載のプロモーターの塩基配列に相補的な配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロモーター活性を有する塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター

(6) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載のプロモーター、発現の目的遺伝子及びターミネーターを含む遺伝子発現カセット。

【0019】

(7) 上記(6)記載の遺伝子発現カセットを含む組換え発現ベクター。

【0020】

(8) 上記(7)記載の組換え発現ベクターを含む形質転換体。

【0021】

(9) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載のプロモータープロモーターの活性を阻害又は促進することを特徴とする、転写活性調節方法。

【0022】

上記プロモーターの活性の阻害又は促進は、転写因子の結合活性を阻害又は促進するものである。また、転写因子の結合部位としてはEts結合部位が挙げられる。転写因子としては、例えばGABP $\alpha$ 、GABP $\beta$ 、GABP $\alpha$ とGABP $\beta$ との複合体、Ets1、Pea3、Tel及びFli-1からなる群から選ばれるいずれかのものを例示することができる。

【発明の効果】

【0023】

本発明により、シノビオリンのプロモーターが提供される。本発明のプロモーターは、シノビオリンの発現を制御すること、また、シノビオリンが発現する部位に、有用遺伝子が発現させることにより、各種疾患（例えばリウマチ）の治療に用いることができる点で有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0025】

## 1. 概要

本発明者は、シノビオリンを中心としたリウマチ病態解析を現在行っている。最近、シノビオリンノックアウトマウスを用いた解析において、ER ストレスによるアポトーシス誘導の域値にERADの機能を担うシノビオリンの量が関与していることを見出した。

【0026】

そこで、アポトーシス誘導の感受性を決定するシノビオリンの量を調節する転写機構を解明するためにプロモーター解析を行った。

【0027】

現在、シノビオリンの誘導的遺伝子発現を担う機構として、ER ストレスを感知しリン酸化されたIRE-1を介しスプライシングされたXBP-1による転写制御が考えられている。この制御機構は以下の通りである。すなわち、ERに不良タンパク質が蓄積すると、ERに局在する膜タンパク質であるIRE-1は二量体化し、分子間自己リン酸化が起こる。その結果、IRE-1内のエンドヌクレアーゼ様ドメインが活性化してXBP-1の未成熟mRNAをスプライシングし、成熟型XBP-1を作製する。このXBP-1がER分子シャペロン遺伝子などの転写を促すと考えられる。

【0028】

しかし、構成的遺伝子発現に関しての報告はない。そこで、まずはじめに、マウス細胞株及びマウス胚を用いてその構成的遺伝子発現を担う部位を決定した。

【0029】

その結果、シノビオリンの構成的発現を担うEBSを同定し、そのエレメントがin vivoにおいてシノビオリンの発現に必須であることを証明した。また、NIH3T3細胞において、そのEBSを介しEts ファミリーの一つGABP $\alpha$ / $\beta$ 複合体がその転写制御に関与していることを示した。

【0030】

シノビオリンの発現は、ヘテロノックアウト (LacZ knock in mouse) の発現解析、ノーザン、ウエスタンによる解析によればユビキタスである。つまり、多くの細胞においてシノビオリンの発現が必要とされていることが考えられる。このことは、シノビオリンノックアウトマウスが全身性のアポトーシス亢進にて胎生致死であることから推察され

る。但し、その発現には強弱があり、特に分泌能力の高い細胞（脾臓、精巣、神経細胞）においてその発現が強い。このことは、一部の細胞においては、シノビオリンの発現が非常に高く要求されていると考えられる。

#### 【0031】

シノビオリンの量を規定する転写制御を解明するため、本発明においてプロモーター解析を行った。転写制御機構には、(i)基本転写複合体を含む構成的遺伝子発現と、(ii)ある刺激に対する誘導的遺伝子発現とがある。現在まで、ER ストレスに対しシノビオリンが誘導されることは報告されているが、その構成的遺伝子発現に関しての報告はない。そこで、本発明者は、構成的遺伝子発現を担うエレメントの検索を行った。

#### 【0032】

シノビオリンのプロモーターにはTATAボックス、イニシエーター配列が存在しない。このようなプロモーター構成の場合、SP1やEts ファミリー等の転写因子がその転写誘導において重要である (Rudge, Exp Cell Res. Mar 10;274(1):45-55. 2002)。

#### 【0033】

Ets ファミリーは、酵母からヒトまで保存されたEtsと呼ばれるドメインをもつ転写因子である。このドメインは、30種類以上のファミリーを形成し、その多くが分化・増殖・アポトーシスを担う分子の転写活性を担っている (D.K.Watson and A.Seth, ; Oncogene. review issue. Dec 18; 19(55) ; 2000)。

#### 【0034】

そのEts ファミリーの中でもGABP  $\alpha$  と呼ばれる転写因子は、ターゲット遺伝子の転写制御においていくつかの特徴をもっている。まず、GABP  $\alpha$  は、Ets ドメインによるDNA結合能をもつが、転写活性化能を持たない。これに対し、GABP  $\alpha$  のコファクターとして働くGABP  $\beta$  はDNA結合能をもたず、GABP  $\alpha$  と2量体を形成することにより転写活性を誘導し、ヘテロ4量体を形成することによりさらに高い転写活性化能を発揮する (Yu M. J Biol Chem Nov 14;272(46):29060-7.1997)。また、GABP  $\alpha$  は、TATAボックスを持たない遺伝子や、複数の転写開始点をもつ遺伝子の発現においてイニシエーターとして働くことができる (Yu M. J Biol Chem Nov 14;272(46):29060-7.1997; Kamura T.J Biol Chem Apr 25;272(17):11361-8.1997)。さらに、GABP  $\alpha$  はその発現がユビキタスであるにも関わらず、他の部位に結合するパートナーの転写因子と相乗的に働くことにより、細胞特異的な分化・増殖に関与する遺伝子の発現を担う (Schaeffer L, EMBO J. Jun 1;17(11):3078-90.1998)。

#### 【0035】

以上のことから、本発明者はシノビオリンの構成的遺伝子発現を担うエレメントを決定し、さらにそのエレメントによるNIH3T3細胞における意義について検討した。

#### 【0036】

##### 2. プロモーター

プロモーター領域を得るには、シノビオリン遺伝子又はマウスやヒトゲノム配列等から、制限酵素を用いて切り出すことが可能である。しかしながら、一般的に都合の良い制限酵素部位が適切な位置に存在するとは限らない。そこで、予め制限酵素認識部位を設けたプライマーを用い、PCR で所望のプロモーター領域を増幅することにより得ることができる。また、既に判明しているプロモーター領域の塩基配列情報をもとにして、所望のプロモーター領域を化学合成することも可能である。

#### 【0037】

配列番号1にマウスシノビオリン遺伝子の全長プロモーター配列を、配列番号2にヒトシノビオリン遺伝子の全長プロモーター配列を例示するが、本質的に転写活性を有する配列であればこれらの配列に限定されるものではなく、全長プロモーターを切断することが可能であり、一部の領域に欠失、挿入、置換、付加などによってその塩基配列を改変することも可能である。但し、本発明においては、コア領域 (Ets結合部位を含む) に変異を導入するとプロモーター活性の低下を来すことが多いため、コア領域への変異の導入は、プロモーター活性を抑制する場合に行なうことが好ましい。

#### 【0038】



本発明のプロモーターにおいて、その機能の中核を担うコア領域は、配列番号1又は2に示す塩基配列のうち、転写開始点（配列番号1又は2に示す塩基配列の第2201番のt）を起点としてその上流側（5'側）に向かって第71番目（-71）から第81番目（-81）までの領域、すなわち、配列番号1又は2に示す塩基配列のうち第2120～2130番目の領域である。

#### 【0039】

従って、配列番号1又は2に示す全長配列において、上記コア領域を含む限り、その長さ限定されるものではない。例えば、後述の表1及び表2（実施例1参照）に示されている全長又は切断型配列であって上記コア領域を含むものも、本発明のプロモーターに含まれる。また、配列番号1又は2に示すプロモーター配列又はこれらの切断型プロモーター配列のうち、上記コア領域を含む配列に対して相補的な配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、シノビオリンのプロモーター活性を有するものも、本発明のプロモーターに含まれる。

#### 【0040】

なお、本発明においては、プロモーター領域の位置を指定する場合、配列番号1又は2に記載の塩基番号を基準として特定する場合と、転写開始点を基準として特定する場合がある。転写開始点を基準とする場合は、配列番号1又は2に示す塩基配列の第2201番目のチミジン(t)を転写開始点(TS)とする。そして、TSを起点として、上流（5'側）方向は負の符号(-)をつけて特定し、下流（3'側）方向は正の符号(+)をつけて特定する。但し、5'方向は、TSの1塩基上流（5'側）の塩基を-1とし、3'方向は、TSの塩基を+1として特定する。例えば、配列番号1に示す塩基配列の第1番目のグアニン(g)は、TSからみて-2201の位置にあり、配列番号1に示す塩基配列の第3043番目のグアニン(g)は、TSからみて+843の位置にあるということになる。

#### 【0041】

「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイゼーションにおいて洗浄時の塩濃度が100～500 mM、好ましくは150～300 mMであり、温度が50～70℃、好ましくは55～65℃の条件を意味する。また、「プロモーター活性」とは、本発明のプロモーター領域に転写因子が結合し、転写を起こさせる活性を意味する。

#### 【0042】

「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ」するDNA断片には、上記ストリンジェンシー条件下において、その一部の領域の塩基配列に欠失、置換、挿入、付加等の変異が生じていてもハイブリダイズし得るものを含む。プロモーターは、種々の長さの切断型を生じるため、ハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有する限り上記欠失、置換、挿入、付加等の変異の数は特に限定されるものではないが、例えば1個又は数個（1個～10個程度、好ましくは1個～5個程度）の塩基に上記変異を生じたものを例示することができる。

#### 【0043】

##### (2) 組換えベクターの構築

本発明の組換えベクターは、本発明のプロモーター、発現の目的遺伝子、ターミネーターを適当なベクターに挿入することによって得ることができる。これを「遺伝子発現カセット」という。遺伝子発現カセットに使用されるベクターとしては、pBR系、pUC系、pBluescript系等の大腸菌プラスミドベクター、あるいはpcDNA3系の哺乳細胞発現用プラスミドベクターやアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを例示することができる。発現の目的遺伝子は、シノビオリン遺伝子に限らず、異種構造遺伝子（例えばIL-1、IL-6、TNF $\alpha$ 等の各種サイトカイン遺伝子、酵素遺伝子、増殖因子遺伝子、ケモカイン遺伝子等）であってもよい。発現ベクターの構成成分をベクターに挿入することは、慣用の技術により当業者が容易に実施することができる。さらに、上記ベクターには、選択マーカー遺伝子などを含めることも可能である。選択マーカー遺伝子としては、G-418等の抗生物質耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子等が挙げられる。

#### 【0044】

本発明において使用し得るターミネーターは特に限定されるものではなく、例えばpoly

A signal等が挙げられる。

【0045】

(3) 形質転換体

宿主へのプラスミドの導入は、宿主の形質転換に用いられてる一般的な方法を採用することが可能である。すなわち、当業者に周知のプロトプラスチ法、リチウム法、エレクトロポレーション法、及びそれらの変法を適用すればよい。宿主は特に限定されるものではなく、例えば大腸菌等の細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等が挙げられる。

【0046】

3. プロモーターの機能解析

(1) 転写活性の解析

プロモーターの転写活性の解析は、一般的に行なわれるルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、CATアッセイ等を採用することができる。これらのアッセイを行なうためのキットも市販されている（例えばpromega dual luciferase assay kit）。

【0047】

例えばルシフェラーゼアッセイの場合は、目的遺伝子の転写開始点の上流にレポーターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結する。また、アッセイの対象となる細胞間の導入効率を補正するために、サイトメガロウイルス (CMV)  $\beta$  ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -gal) 遺伝子をレポーターとしてプロモーターの下流につないだベクターを細胞に同時に導入してもよい。細胞への導入は、例えばリン酸カルシウム法等を採用することができる。ベクターを導入した細胞は所定時間培養した後に回収し、凍結-融解等によって細胞を破壊した後、一定量の細胞抽出液を用いてルシフェラーゼ及び  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性を測定する。

【0048】

(2) EMSA

細胞の分化や活性化は遺伝子発現によって制御されており、転写レベルの遺伝子発現の調節は特に重要な役割を担っている。転写因子の多くはDNAの応答性配列 (response element) に異なった様式で結合することが明らかになりつつある。この転写因子相互の複雑な関係を解析する方法の1つとして、ゲルシフトアッセイ (EMSA: electrophoretic mobility shift assay) がある。ゲルシフトアッセイとは、放射又は非放射標識されたプローブDNA断片とDNA結合タンパク質とを混合し、低塩濃度の未変性ゲルで電気泳動を行ない、DNAをオートラジオグラフィー等で検出する方法である。タンパク質と結合したDNAは、遊離DNAと比較してゲル中で遅れて移動するため、特異的バンドとして検出することができる。DNA-タンパク質複合体に特異的抗体を作用させると、その移動度はさらに小さくなる（これをスーパーシフトという）。多くの転写因子は、この方法で同定することができる。

【0049】

ところで、細胞において、分泌タンパク質、膜タンパクなどの小胞体を経て合成されるタンパク質の一部は、小胞体の中で不良タンパク質となっており、その不良タンパク質の分解のため、細胞に必要な機構であるERADを担う分子の発現が必要である。このことは、後述の実施例に示すように、シノビオリンのノックアウトが胎生致死であることから明らかである。すなわち、シノビオリンは細胞に必要最低限の発現が必要であると考えられる。この転写制御に必要な部位がEBS (Ets binding site) である。このEBS部位を介したシグナルの異常は、細胞機能の維持にとって抑制的に働く。これに対し、Ets ファミリーは種類や発現が多様であり、部位への結合能が他のパートナーと相乗的に働く。これらのことは、EBS部位を介して種々のEts ファミリーの転写制御機構を備わっていることを意味する。

【0050】

従って、EBS部位に結合するタンパク質の作用を促進又は阻害することにより、本発明のプロモーターの転写活性機能を調節することができる。

【0051】

転写因子としては、GABP  $\alpha$ 、GABP  $\beta$ 、GABP  $\alpha$  と GABP  $\beta$  との複合体、Ets1、Pea3、Tel、Fli-1などが挙げられる。

## 【0052】

GABP $\alpha$ は、EtsドメインをもつEtsファミリーの一つであり、454アミノ酸を有するタンパク質である。GABP $\alpha$ は、細胞においてユビキタスに発現する。Etsドメインを介し、GABP $\beta$ とヘテロ2量体を形成する。さらに、2つのEts結合部位を使用し、ヘテロ4量体を形成することが知られている。

## 【0053】

GABP $\beta$ はGABP $\alpha$ のコファクターであり、382アミノ酸を有する。Etsファミリーではない。Ankyrinリピート配列を介しGABP $\alpha$ とヘテロ2量体を形成する。また、転写活性ドメインをもつ。

## 【0054】

Ets1は、1983年に鶏に赤芽球症を起こすレトロウイルスE26の癌原遺伝子として発見されたv-ets のヒトホモログであり、441アミノ酸を有するタンパク質である。

## 【0055】

Telは、452アミノ酸を有するタンパク質であり、Etsファミリーの中でも、転写抑制に働くことが報告されている。臨床的には、t(12;21)の染色体転座によりAML1と癒合遺伝子を形成し、白血病を起こすことが知られている。

## 【0056】

Fli-1は、t(11;22)染色体転座によりEWSと癒合遺伝子を形成し、ユーイング肉腫を起こすことが知られている。452アミノ酸を有する。

## 【0057】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

## 【実施例1】

## 【0058】

シノビオリンプロモーターの作製

## (1) プラスミド構築

マウス(C57Bl/6系)のゲノムより、シノビオリン遺伝子を含む5'から3'まで約7.5 kbpのゲノムをSyB/pBluescript にサブクローニングした。その後、シノビオリン遺伝子のプロモーター領域をXhoIとNcoIで処理し、約3kの断片を抜き出し、PGV-B2 (TOYO INK GROUP)の中に挿入した(SyG-2.2k)。この約3kの断片を全長プロモーターとした(配列番号1)。さらに、全長プロモーターの5'側から一部の領域を削除し、プロモーター領域を短くしたコンストラクトを作製した。作製したプロモーターをまとめると表1の通りである。

【表 1】

表 1 作製したプロモーター一覧表 (マウス)

| 名 称                | 領 域*   | 配列番号 1 に示す塩基配列の領域 |
|--------------------|--|-------------------|
| -2201/+843<br>(全長) | TS(転写開始点)を起点(+1)として上流(5'側)に 2201 塩基、<br>下流(3'側)に 843 塩基の領域 | 1~3043            |
| -1233/+843         | TS を起点として上流に 1233 塩基、下流に 843 塩基の領域                         | 969~3043          |
| -1060/+843         | TS を起点として上流に 1060 塩基、下流に 843 塩基の領域                         | 1142~3043         |
| -503/+843          | TS を起点として上流に 503 塩基、下流に 843 塩基の領域                          | 1699~3043         |
| -322/+843          | TS を起点として上流に 322 塩基、下流に 843 塩基の領域                          | 1880~3043         |
| -200/+843          | TS を起点として上流に 200 塩基、下流に 843 塩基の領域                          | 2002~3043         |
| -108/+843          | TS を起点として上流に 108 塩基、下流に 843 塩基の領域                          | 2094~3043         |
| -84/+843           | TS を起点として上流に 84 塩基、下流に 843 塩基の領域                           | 2118~3043         |
| -73/+843           | TS を起点として上流に 73 塩基、下流に 843 塩基の領域                           | 2129~3043         |
| -65/+843           | TS を起点として上流に 65 塩基、下流に 843 塩基の領域                           | 2137~3043         |
| -39/+843           | TS を起点として上流に 39 塩基、下流に 843 塩基の領域                           | 2163~3043         |
| -10/+843           | TS を起点として上流に 10 塩基、下流に 843 塩基の領域                           | 2191~3043         |

\* 領域は、上流(5'側)に向かうときは TS (配列番号 1 の第 2201 番の t) の 1 個 5'側の塩基を-1 として数え、下流(3'側)に向かうときは TS を+1 として数える。

なお、ヒトのシノビオリン遺伝子の切断型プロモーターも、マウスの場合と同様に作成することができる。この場合の切断部位の位置を表 2 に示す。

【表 2】

表 2 作製したプロモーター一覧表 (ヒト)

| 名 称                | 領 域*   | 配列番号 2 に示す塩基配列の領域 |
|--------------------|--|-------------------|
| -2201/+892<br>(全長) | TS(転写開始点)を起点(+1)として上流(5'側)に 2201 塩基、<br>下流(3'側)に 892 塩基の領域 | 1~3092            |
| -1233/+892         | TS を起点として上流に 1233 塩基、下流に 892 塩基の領域                         | 969~3092          |
| -1060/+892         | TS を起点として上流に 1060 塩基、下流に 892 塩基の領域                         | 1142~3092         |
| -503/+892          | TS を起点として上流に 503 塩基、下流に 892 塩基の領域                          | 1699~3092         |
| -322/+892          | TS を起点として上流に 322 塩基、下流に 892 塩基の領域                          | 1880~3092         |
| -200/+892          | TS を起点として上流に 200 塩基、下流に 892 塩基の領域                          | 2002~3092         |
| -108/+892          | TS を起点として上流に 108 塩基、下流に 892 塩基の領域                          | 2094~3092         |
| -84/+892           | TS を起点として上流に 84 塩基、下流に 892 塩基の領域                           | 2118~3092         |
| -73/+892           | TS を起点として上流に 73 塩基、下流に 892 塩基の領域                           | 2129~3092         |
| -65/+892           | TS を起点として上流に 65 塩基、下流に 892 塩基の領域                           | 2137~3092         |
| -39/+892           | TS を起点として上流に 39 塩基、下流に 892 塩基の領域                           | 2163~3092         |
| -10/+892           | TS を起点として上流に 10 塩基、下流に 892 塩基の領域                           | 2191~3092         |

\* 領域は、上流(5'側)に向かうときは TS (配列番号 1 の第 2201 番の t) の 1 個 5'側の塩基を-1 として数え、下流(3'側)に向かうときは TS を+1 として数える。

次に上記マウス由来プロモーターの変異体を作製するため、オーバーラップ伸長による部位特異的変異誘発法(Molecular cloning, CSHL Press, 3edition, 2001年, chapter 13

1) を用いて SyG-2.2kG-76T/BV2 を作製した。使用した Primer を以下に示す。

【 0 0 5 9 】

1. EBSm(G-76T): GCGCCGCGTAAGTGAGGT (配列番号 3)
2. AMLm(G-68T): AAGTGAGTTGTCTTACCCCC (配列番号 4)
3. SP1m(G-92A, C-91A): ACTCCGCCAAGCCCCGCGCC (配列番号 5)

PCR は、反応液 50  $\mu$ l 中、1 pmol SyB/pBluescript、100 pmol プライマー、0.2 mM dNTPs、5 U ポリメラーゼ、10 mM Tris-HCl (pH8.3) 及び 50 mM KCl を含む反応組成液を用いて、以下の PCR 条件で行なった。

【 0 0 6 0 】

PCR 条件

第一段階: 94℃、1分 → (94℃、30秒 → 55℃、30秒 → 72℃、1分) × 25回

第二段階: 1 サイクル目: 94℃、1分 → 55℃、30秒 → 29分かけて 30℃ に落とす → 30℃、1分 → 9分かけて 72℃ に → 72℃、1分 → (94℃、30秒 → 55℃、30秒 → 72℃、1分) × 25回

EBSm(G-76T) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2125 番目 (TS から上流に向かって 76 番目 (-76)) の G を T に変異させるためのプライマーであり、AMLm(G-68T) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2133 番目 (TS から上流に向かって 68 番目 (-68)) の G を T に変異させるためのプライマーであり、SP1m(G-92A) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2111 番目 (TS から上流に向かって 92 番目 (-92)) の G を A に変異させるためのプライマーであり、SP1m(G-92A, C-91A) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2112 番目 (TS から -91 番目) の C を A に、かつ、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2111 番目 (TS から -92 番目) の G を A に変異させるためのプライマーである。

【実施例 2】

【 0 0 6 1 】

シノビオリンプロモーターの機能解析

シノビオリンの量の調節機構を解明するために、プロモーター解析を行った。なお、シノビオリンは、トランスジェニックマウス (LacZ knock in) の解析、並びにノーザン及びウエスタンの結果よりユビキタスに発現していることがわかっている。

【 0 0 6 2 】

まずはじめに、シノビオリンプロモーターのクローニング後、翻訳開始点より 2.2k を含む領域をルシフェラーゼベクターに結合させた。様々な細胞 (下記) を用いて、上流側から削ったコンストラクションにてその転写活性を調べた。なお、細胞は、10% 不活化ウシ胎児血清添加 DMEM 培地 (Life Technologies, Inc.) を用いて培養した。

【 0 0 6 3 】

使用した細胞

ATDC5: マウス teratocarcinoma 細胞 AT805 由来の亜株。軟骨および色素細胞特異的。アルカリフォスファターゼ陽性。

【 0 0 6 4 】

HEK293: ヒト胎児腎臓由来細胞

NIH3T3: マウス胎仔由来線維芽細胞

トランスフェクションとレポーターアッセイは以下の通り行なった。

【 0 0 6 5 】

細胞を  $2 \times 10^4$  /well にて 24well プレートに準備した。その 24 時間後、FUGENE 6 キットを使用し、キットのマニュアルに従ってトランスフェクションした (Biochem. Roche)。

【 0 0 6 6 】

またトランスフェクション効率の補正のため、CMV- $\beta$ -gal を各 50ng 使用し、さらに全ベクターのみを入れて全量を 200ng にそろえた。

【 0 0 6 7 】

トランスフェクション後 30 時間でタンパク質を回収した。まず、培地を捨てた後、PBS で洗い、Passive 溶解バッファー (Promega) を 100  $\mu$ l 用いて細胞溶解物を回収した。次

にその細胞溶解物の20 $\mu$ lを96wellプレートに移した後、ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、 $\beta$ -gal活性をプレートリーダーにて測定した後、 $\beta$ -gal値でLuc値を割り補正した。なお、 $\beta$ -gal 染色は以下の通り行なった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼはX-galを用い、染色した(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド;Sigma)。胚を4% パラホルムアルデヒドで20分間固定し、X-gal溶液に浸した後、37℃で12時間～24時間染色した。染色後、PBSで洗浄し、再度4% パラホルムアルデヒドで固定した。

#### 【0068】

その結果、-84から-73bpの12塩基においてその転写活性が10から30%に低下した(図1a、b)。

#### 【0069】

その領域を含む-114から-1においては、マウスとヒトで94%の相同性をもち、さらに12塩基においては、100%の相同性を認めた。コンピュータを用いたバイオインフォマティクス解析ソフト(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>)にて解析を行った結果、その12塩基にEBS(Ets 結合部位)が存在することが判明した(図1c)。

#### 【0070】

次に本発明者は、その領域を含む前後の領域における転写因子結合配列に変異を導入し、いくつかのCell lineを用いその部位の転写に及ぼす影響について検討した。

#### 【0071】

図1d.にみられるようにEBS(GBSともいう)の点変異により、ほぼすべてのCell lineにてその活性が約9から40%程度に低下した。これらのことから、このEBSは、シノビオリンの構成的発現を担う必須のエLEMENTであると考えられた。

#### 【実施例3】

#### 【0072】

EBS(-89から-65)につく転写因子の同定

Ets ファミリーは30種類以上のファミリーを形成し、すべてDNA結合ドメインであるEtsドメインを持っている。またその中心配列はGGAAであり、その配列への結合にはその配列に続く配列が重要であると考えられている。

#### 【0073】

まず、その12塩基配列を含んだプローブを使用し、実際にその配列に転写因子が結合するかどうか検討した。この転写因子の結合試験は、ゲルシフトアッセイ(EMSA)を行った。

#### 【0074】

EMSAは以下の通り行った。

#### 【0075】

Probe

EBS WT; (-89から-65): CCCC GCGCCG CCGGAAGTGT (配列番号6)

EBS MT; (-89から-65): CCCC GCGCCG CCGTAAGTGT (配列番号7)

EMSA用のプローブは、25塩基配列のセンス鎖とアンチセンス鎖を90℃で10分アニーリングさせることにより作製した。

#### 【0076】

次に、T4ヌクレアーゼキナーゼ、バッファーおよび $\gamma$ - $^{32}$ Pを混合し、混合液を室温で30分反応させた。反応液をMicro Spin G-25カラム(Amersham Pharmacia Biotech社)に通し、採取されたカラムのフラクションを遠心にて分離し、標識したプローブを得た。放射活性は1 $\mu$ lあたり30000cpm以上のものを使用した。

#### 【0077】

10 $\mu$ gのタンパク質、反応バッファーおよびプローブを混ぜ、室温で30分反応させた。スーパーシフトの場合は、プローブと反応させる前に1時間4℃で反応させた。その反応液を非変性ゲルにて100v、50mAで3時間程度泳動させた。ゲルを乾燥させた後、Fujii BA

S2000を用いオートラジオグラフィーにて解析した。

【0078】

その結果、NIH3T3の核抽出液を使用したゲルシフトにより、4つのバンド（図2aのa、b、c、dの位置のバンド）が形成されることが判明した。さらにcold competition（標識していないプローブを用いた競合試験）により、そのすべてのバンドが消失し、1塩基変異を入れたプローブにおいてはその阻害が見られなかった（図2a）。

【0079】

次に、どのEts ファミリーが結合するかを検討するため、Ets1/Pea3、Ets プローブのcold competitionを行ったところ、ets1/pea3のプローブで競合阻害され、その変異によりその阻害が消失した（図2b、5と6番のレーン）。

【0080】

このことは、Ets1/Pea3 プローブ（Santa Cruz社より購入）に結合する因子であるEts 1、Pea 3、GABP  $\alpha$  等の転写因子である可能性が考えられた。さらにさまざまな抗体を使用して、スーパーシフト試験を行ったところ、GABP  $\alpha$  とTelがスーパーシフトし、Fli-1は阻害効果を示した（図2bの5、6番のレーン、図2cの6、7、8と10、11、12番のレーン）。また、GABP  $\alpha$ 、Fli-1、ets1のin vitro 翻訳産物でゲルシフト試験を行ったところ、そのすべてにスーパーシフトが見られた。これらのことから、この配列には複数のEts ファミリーが結合することが示された。

【0081】

次に、スーパーシフトしたGABP  $\alpha$  によるGABP  $\beta$  との複合体形成について検討を行なった。それぞれin vitro翻訳産物を用い、ゲルシフト試験を行ったところ、GABP  $\alpha$  タンパク質にGABP  $\beta$  タンパク質を加えたレーン7において、新たなバンドa、b（複合体）の形成が認められた（図2d）。さらに、GABP  $\alpha$  抗体を加えるとその複合体a、bが消失しスーパーシフトした（図2d、レーン8、9）。またGABP  $\beta$  抗体を加えたところ、複合体aの形成が阻害された（図2d、レーン10、11）。

【0082】

これらのことから、GABP  $\alpha$  /  $\beta$  は、シノビオリン プロモーターのEBSにて複合体を形成することがわかった（図2d）。

【実施例4】

【0083】

NIH3T3 におけるEts ファミリーによる転写制御およびGABP  $\alpha$  とFli-1、Ets1のシノビオリン転写活性に対する効果

それぞれEBSに結合する転写因子の細胞内でのシノビオリンの転写活性化能を評価するため、転写活性化アッセイを行った。

【0084】

(1) ODNのオリゴ作製と細胞抽出液の作製

20ヌクレオチド長のオリゴデオキシリボヌクレオチド（ODN）は化学合成により得た。デコイODNはセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドのアニーリングにより作製した。対数増殖期の細胞をトリプシン処理し、96-well プレート（ $1 \times 10^3$  個/well）に移した。24時間後、1ウェルあたり20pmolのdecoy（デコイ）ODNをウェルに入れ、LipofectAMINE（Invitrogen, San Diego, CA）を用いてキットの説明書に従って3日間トランスフェクションを行った。デコイODNを有する細胞の増殖を決定するために、Alamar Blue（Biosource International）を用いて、キットの説明書に従って細胞増殖アッセイを行った。

【0085】

(2) RNAiのオリゴ作製と細胞抽出液の作製

21ヌクレオチド長のRNAは化学合成により得た。siRNAはElbashir et al (2001)のプロトコル（Elbashir, S.M., Nature 411: 494-498. 2001）に従って作製した。対数増殖期の細胞をトリプシン処理し、96-well プレート（ $1 \times 10^3$  個/well）に移した。24時間後、1ウェルあたり20pmolのsiRNAをウェルに入れ、LipofectAMINE（Invitrogen, San Diego, CA）を用いてキットの説明書に従って3日間トランスフェクションを行った。siRNA細胞

の増殖を決定するために、Alamar Blue (Biosource International)を用いて、キットの説明書に従って細胞増殖アッセイを行った。

#### 【0086】

##### (3) 結果

NIH3T3において、Fli-1はシノビオリン転写活性を抑制し、GABP  $\alpha$  はその転写活性を増加させる結果が得られた (図3a、b)。また、GABP  $\alpha$ 、GABP  $\beta$  のRNAiにてノックアウトしたNIH3T3細胞では、シノビオリンの転写も低下が認められた (図3c)。これらのことからNIH3T3において、GABP  $\alpha/\beta$  複合体がシノビオリンの発現を担っていることが考えられた。

#### 【0087】

さらに、そのGABP  $\alpha/\beta$  複合体がEBSを介してシノビオリンの転写活性を担っていることを証明するため、EBS (G-76T) 変異体およびEBS wildをもつプロモーター (-200から+843) を使用し転写活性アッセイを行った。

#### 【0088】

その結果、変異体が全く活性化されないにもかかわらず、野生型では約3倍の転写活性がみられた。

#### 【0089】

##### (4) ウェスタンブロッティング

最後にNIH3T3を200nMのデコイで処理した後、シノビオリンの発現をウェスタンブロッティングにて評価した。

#### 【0090】

ウェスタンブロット解析は以下の通り行った。すなわち、細胞培養物を回収し、1% NP-40, 25mM Tris-HCl, pH6.8, 0.25% SDS, 0.05% 2-mercaptoethanol and 0.1% glycerolを含む溶液中で溶解させた。透明な細胞溶解物のアリコートにSDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離した。分離したタンパク質をニトロセルロース膜に移し、抗シノビオリンモノクローナル抗体を用いてイムノブロットを行った。結合した抗体を、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン及びECL 検出システム (Amersham Pharmacia Biotech) により検出した。

#### 【0091】

その結果、EBS野生型で処理したシノビオリンの発現は約半分に低下した。

#### 【0092】

これらのデータからGABP  $\alpha/\beta$  によりEBSを介して、シノビオリンの転写が制御されていることが示された。

#### 【実施例5】

#### 【0093】

マウス胚におけるシノビオリンの発現に必須の部位の同定

次に、マウスの胚においてin vivoにおけるEBSの効果を確認するため、シノビオリンプロモーターにLacZを結合したプラスミドを過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。Tgは全長3kと1kのプロモーターとそれぞれ1塩基変異を入れたプロモーターを過剰発現させた4種類を作製した (図4a)。

#### 【0094】

トランスジェニック (Tg) マウス用のコンストラクションとTg マウスの作製は以下の通り行なった。

#### 【0095】

SyG-2.2k/BV2からNotIとNcoIで約3kの断片を抜き出した後、SyTB/pbsへ挿入し、SyL-2.2kwt/pbsを作製した。さらに、SyL-2.2kmg-76T/pbs、SyL-200wt/pbs及びSyL-200mg-76T/pbsを、それぞれSyGより取り出した断片を用いて作製した。各構築物について、それぞれQIAGEN Plasmid Kit (QIAGEN) を使用し精製後、ScaIにて線状化したDNAをBDFマウス (C57BL/6NとDBA/2Nの交配による仔マウス) の受精卵の核内に直接マイクロインジェクションし、仮親の卵管に移植した。それぞれ、8から9母胎より誕生したマウスの尾からゲノム



を抽出し、サザンブロット法にてTg マウスであることの確認を行った。

#### 【0096】

これらのTgマウスからシノビオリンの発現を検討するため、胚によるX-gal染色を行った。そのLacZをノックインしたノックアウトマウスの胚におけるLacZの発現と今回作製した4つのTgマウスの発現を比較検討した。

#### 【0097】

シノビオリンの11.5から14.5 d.p.c (days post coitus: 胎齢) の胚を使用し、LacZ染色を行った。3kと1kの プロモーターを導入したトランスジェニックマウスは、ヘテロノックアウトマウスとほぼ同じ部位に染色がみられた。驚いたことに、1塩基変異を導入した3kと1kのプロモーターを導入したトランスジェニックマウスは、そのどちらも発現部位がその系によりランダムになることが確認された(図4b)。

#### 【0098】

転写活性化に必要な領域がなくなると、上記結果と同様の結果が得られることが報告されている(pax5, coll1a2等)。これらのことから、EBSは、シノビオリンの転写に必須の部位であることが判明した。

#### 【0099】

さらに、その発現とGABP  $\alpha$  の発現を13.5 d.p.cの胚を用いて比較したところ、ほぼ同様の部位に発現していることが判明した(図4c)。以上の結果より、胚発生においても、in vitroの結果と同様、GABP  $\alpha$  がEBSを介してシノビオリンの発現を制御していることが示された。

#### 【実施例6】

#### 【0100】

RA滑膜細胞におけるシノビオリンの発現

リウマチの滑膜細胞におけるEBSを介したGABP  $\alpha$  の効果について検討を行ったところ、滑膜細胞の核抽出液を用いたゲルシフトにおいても、NIH3T3の各抽出液のときと同様にGABP  $\alpha$  にてスーパーシフトが得られた。さらにそのEBSのリウマチ滑膜細胞における意義、すなわちGABP  $\alpha$  によるEBSを介した転写制御がシノビオリンの発現抑制につながり、最終的に滑膜細胞の増殖抑制となるかことを確認するため、EBS デコイによるシノビオリンの発現抑制について検討した。

#### 【0101】

その結果、約半分にその発現の低下が認められた(図5)。

#### 【0102】

以上の結果から、RA滑膜細胞においても、GABP  $\alpha/\beta$  がシノビオリンの構成的遺伝子発現を担っていることが証明された。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0103】

【図1a】 切断型シノビオリンプロモーターの活性を示す図。

【図1b】 切断型シノビオリンプロモーターの活性を示す図。

【図1c】 シノビオリンプロモーターのEts結合部位及びコア領域を示す図。

【図1d】 プロモーターに変異を導入したときの転写活性を示す図。

【図2a】 ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真。

【図2b】 ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真。

【図2c】 ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真。

【図2d】 ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真。

【図3a】 シノビオリンプロモーターの転写活性を示す図。

【図3b】 シノビオリンプロモーターの転写活性を示す図。

【図3c】 RNAiを利用してノックアウトしたNIH3T3細胞におけるシノビオリンプロモーターの転写活性を示す図

【図4a】 3kと1kのシノビオリンプロモーターにLacZを結合したプラスミドの構築図

。

【図 4 b】 マウス胚におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真。

【図 4 c】 マウス胚におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真。

【図 5】 RA滑膜細胞におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真。

【配列表フリーテキスト】

【0104】

配列番号 3：合成DNA

配列番号 4：合成DNA

配列番号 5：合成DNA

配列番号 6：合成DNA

配列番号 7：合成DNA

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Locomogene, Inc.

&lt;120&gt; Synobiolin promoter

&lt;130&gt; P03-0115

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; PatentIn version 3.2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3046

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 1

|  |     |
|--|-----|
| gcaagagacc ttatittgtt tttcgagaca gggtttctct gtgtagccct ggctgtccta  | 60  |
| gaactcactc ttagaccag gctggcctcg aactcagaaa tccgcctgcc tctgcctccc   | 120 |
| gagtgtctggg attaaaggta ggcgccacca cgcccagctt tttttttttt agataggatc | 180 |
| tcactctata gctgtacgct ggcctcagat ttatgatgct cttcctgcct cagtctccca  | 240 |
| attttctggg attgtaggag tgggccacta tgctctgctc actacatgat ttcagagggt  | 300 |
| gagtagacct gaactgaaga ccagacaagg gagccctccc tcgacatctt ggggccaggg  | 360 |
| aagttgaagc cataggatca gaggaaatgt ggcaagaaaa aaggccaaca tggacacaga  | 420 |
| acttaaataa aaacagacag aggaagtaag acagatatat acctggggga gaggagggat  | 480 |
| tgccacaaaa tgtaggagat tttcaagaat gggggaggat gagtgtgtag ggttaaaggt  | 540 |
| agccagtaga agttcatagc tagccttatg gaggaaggaa aggggagcca tctcgggatg  | 600 |
| ttactgtta aagacaacag gtggtggtga agatggctga gaccaagagc acagggctga   | 660 |
| ggggcagaca ggcactgaca ctgctaccct ttaatacagt tcctcctgtt gtgatcccca  | 720 |
| accataatta cttcgttgct acttcataac tgtaattttg ctagttatga attgtaagta  | 780 |
| aacgtctgat atgcaggata tctcatttgt gaccctgtg taacggtttg attcccaaag   | 840 |
| ggcttacgac tcacaggttg agagccagcc actgccttaa agtcgtctag aatcagtttt  | 900 |
| ctttcttttt tgacagacaa gatgtttaat tccgttgtac tgaaggaaag ccattttatg  | 960 |

tatattttctt aagtgcicta tcagtaatga caattctgaa agcccctgtg ttatatattta 1020  
acaacacagt cacctccggt tctgtattca ctgtccgtgt tgtgactccc acagtataaa 1080  
ttcctccagt tgatcttcat gaattcttat atttgatccc cccccccctt aggccctctga 1140  
attccgagtg agtccgagtt aaaaatggga ggagcacctt ctagctgata aacctgggta 1200  
atgaggtgtc cgctttcagt ttccattctg tacgcgacta tactgcttgt gtgagcccta 1260  
acagacagaa tcagctcaga acaaagggtc tggctatctc ccagggatga acacgcacgc 1320  
cgactgagct tttgggggtgt tgaaaagtca acgccttcgc acagaactct ccaccccaac 1380  
ctagaaataa ctggcgttct gttttatgtc agtccggaca cgcaagcact gtccttttg 1440  
cgggccccgt aagcatcccc ccaggcgga tagggatccc cggcctatgg actgcgcttt 1500  
ctcagctggc atccagctgc cttggcaccc agtccggggc cactctgcct acagacccta 1560  
gcaaccactc acctgctttt ctttcctat aggccagaaa ttttccctt cttttctcat 1620  
tggtccgct aactttatcg caaccaatcg gcggtacacg ggaacaaact cactcctaca 1680  
caacctgcgt tggggggagg taacctggga agacctatat ctgttttctg caccgctatt 1740  
tttttccgag aagcacttaa cttcttaccg tgtcgtagct atccctggaa tgaggcgctt 1800  
acacatttta tttctttcat gcctgacata aagtctggcc cttgctcgt cctgcccccc 1860  
gtccaaatgg ctcggcccgcc ggaacgcca tcttccaggc acattgagag ccggagtctt 1920  
ggaggggagt taggggtgtg attctacaac ggcgactagc aagtggcggg cttcagccct 1980  
ttcccgctgc tctcctggtc gcgaccacac gtcacagctc tcgctcgttc cggttgctcg 2040  
cgcaggggggt ggggagtggt gttaaccgga gcggctgccg cagtcgcggt gattgagcgt 2100  
actccgccgc gccccgcgcc gccggaagtg aggtgtctta cccccgaagt tccggttcgc 2160  
aggggggtggg gagtgttggt aaccggagcg gctgccgcag tcgcggtgat tgagcgtgct 2220  
cgcggcgctg ggctcctggt gagtgggcct ggtcctgatt ggggttgggg ggtcggcgctc 2280  
taggaccttg tcctttgggg tctactgcgat cagcccggcc cgctgcgttc ggccgccagt 2340  
tttcggcctg tcagatggct ggagacctta ggcgggcgcg cggccaccgt tccagaggcc 2400  
gggccccgcc tgcgagggtc gcaactccta gcgttcacag gtgcgcgact gtgaggcgac 2460

ctgactgggtt ctcagccccg ccgcccgcacc ctggcgggtcg gccgtttctc cggttctcag 2520  
 agtggacact gctggggggcg gggggggggg cagggttcca gactgacgta ccccgatggg 2580  
 cgcgcgtctg cgctgaccac cctggcacag ctgtcactgg ttgtgtcgcc ttctcaagct 2640  
 gtgccctctg caccitgcct cctccacccc tggcggggccc agcgaacctg cctctaaagc 2700  
 ctatcatccc agctccttca gagggtcagc ggtggcagcc cccctcctcc taactttgcc 2760  
 tcagtgactc cctagaggag gcgccttggc agacagcgtg gaagagccct agatttgaaa 2820  
 cgagattgat ccaagttcta ggccttgcct cagtgtgagc ctctaacccc tttgagtcct 2880  
 agtttctcgt ttgtgaaaca gggagtatat gctgttttga atctaattggc tgtcaagggtg 2940  
 aaatgagtgt ttgcccttac actctgccag ggactgtgct aggtttacat agtgtggata 3000  
 tcacaaatgt cattttcctt gtgcaggtct ctgggccagg gcgatg 3046

<210> 2  
 <211> 3092  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 ttggctcata acctcacttc ctttaagtct ttgctcaaat gtcaccttct caaggaagct 60  
 taccgatta tcctcgtga tactgcaacc agcttcaagt accccaccac atcctgatcc 120  
 cctttattct gttctacttt ttctctatag cactgatcat cttccagcgt attagatttt 180  
 tcacttatgt ctgtggtttg ctgtcacatc tactaggata agctccacaa aggtagagat 240  
 ctttatattg ttactgaca tcctaagtcc ctagaacagg agacacttga tccatatttg 300  
 tagactaact gaataaatga cttaattacc agtttggatg tgggggcaga tagtgagcat 360  
 gatgcccgtt tccggagctg ggggtgcagac agtgtctagg gacactgaac tgttttaaaa 420  
 gcaggataga tcccggctgg agaccacaca aggaaatcat cagcacctgg gtcaggggct 480  
 ggactggagc agaggaaatc atgcaggaaa agtaaagaga aggacatcag gtaaagagaa 540  
 gaggacacat gcatagccag agagaaaaga ggagcagagg catgtggatc acagaagctt 600  
 agggaggaga ctttcaagaa ggggagagag gttgagtcaa gcaagggtg aaagccaacc 660

attggatgca gtcactagaa agttacagat aggcaaggtg ttgtggctca cgcctgtaat 720  
cccaacacct tgtggggctg aggtgggagg atcgcttgag cccgggaggt cgaggctgca 780  
atgagccctg atggcgccaa tgcactccag cctgggcgac agagcaagac cctgtcgcaa 840  
aaattaataa ataaataaat aaaaagaaaa gggggaaaaa aagttatacg tggccttacg 900  
gggaagccaa ctctgactgg ttataagctg aaactgtcaa gtcaacaggt ggcagggaag 960  
atggctgaga ccaacagcac agagatttag aggcagacag acctggcgcc aatcctagga 1020  
caggttttgg taagcctttg aatttcaatt gcccacgtt tcgggggagg gggtagcacc 1080  
ccctagctca taaaccttag tgattgatga tttaatgaga tgacggagga aaacgcaagg 1140  
cacaaagtgg atgcattagc tccattttgt taatcagcag gcttagttgg ctgcgaccca 1200  
gacacgaact aaaatacagt gcagcccagg accagtgggg gtcttgctta tggctcagag 1260  
ctgaacaaca catgggcagc aaaatcagac actgagatgc gggcaggcct gcgacgtga 1320  
agtcaattcc tttgaacaaa cagaacactt ccgtccaag attagcagga attaattctc 1380  
cagtctcggg tacacctggg tgtccctccc tgcctggcg cggcaaactg tcccggaggc 1440  
cagccaggga tcactcgccc aaggactgag ctttccctac tctcagccaa ctggagcggg 1500  
accagggcct aggcaacgca gctgtccgcc cctaacaacc actcacctgc tttccccttt 1560  
ctataggcca gcaaaggtag attctttttc ttattgggcc gcgtaactta tcgcaaccaa 1620  
tcagtggcag ccacgggacc caactcactc ccacacaact tgtgggggtg atcatggaga 1680  
agacaaattt ttgttttccg catccagttc tctcagagag caccgtattt gtcaaactgt 1740  
tgtgactctc cctaaatggt taagaaaaca ttctattccc ctcaggcttg tatagtctgt 1800  
ccctggccta ctccccgtc caggtggtag agcccgaag cggctcccct tcccagctgc 1860  
tcgcggggcc gagtccccca gtccgaggag gccactcagc gcaggagcca taccatctgt 1920  
gactaataaa taataggggg acctccgact cccccctgtt gccttattac cttccgacca 1980  
cctctcggac ctcttgccca gcccttcccc gtagacatca ccccagatac ggtgggtgaca 2040  
ccattgctat gggcccacgt agggcgagc gcgagccagg gcaggacgca cttggtacga 2100  
cccacgccgc gccccgcgcc gccggaagtg aggtgtctga cccccgaagt tccggttcgc 2160

aggggggtggg gagtggtgtt aaccggaggg gcagccgcag tcgcgcggat tgagcgggct 2220  
cgcggcgctg ggttccttgt gagtggggcg aagtctggcc cgagttgtgg ttgggggtcgg 2280  
gaccgaacc tttcccttga ggtctccgga gtcggcacgc ccctcagccc cgccgcacgc 2340  
tttcggcctg tcagctggcc ggagacctca gacgccggtg cggccgcttt gctcaagcct 2400  
gggcccctgcc tgcgacgccc gcaactcctg gtgctcacag gtgcgcggcc gcgagggcgga 2460  
cccggctcct ccggtcccgc tgctgctctc tcccgtcccg ctgtttttgt ggtgctctga 2520  
gttgacacta ctccgggggt cgggggaccc caggattcca ggctgacgtt ccccgcccgc 2580  
tcccgcaggg cgggcgtccg aactgcccac cctaacacag ctgtcaccgg cgctgtcgcc 2640  
tgcccagcct gctatcctct gtgccttggc tgctctcagc cctggctgcg cattcccgc 2700  
cctggagcag atttctgctg ttgcctccca cccatcttc tccaccggag ggtcagcgg 2760  
gcagctcccc ctctccaac attgcagctt ttcctcatca cctccctaga ggaggcggct 2820  
tggcaggcag cgtggaaaga gccctagatt tgaagcaaga ctgaccaggg ttccaggcct 2880  
tgcgtcagtg tgatcactta accccttcga gtctaatttg taaaatgggg tagcgtaagc 2940  
tattctttgt ctgatgattt cgagggcgaa atgtgatttc cccccactt tctcctatga 3000  
attgaggctg tgccaggcac cgggctattt tgcacagcac gagcatcaca taagttattt 3060  
tcttgcccca tgcaggtctc cgggccaggg ca 3092

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 3

gcgcccgggt aagtgaggt

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic DNA

&lt;400&gt; 4

aagtgagttg tcttaccccc

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic DNA

&lt;400&gt; 5

actccgccaa gccccgcgcc

20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic DNA

&lt;400&gt; 6

ccccgcgccg ccggaagtgt

20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic DNA

&lt;400&gt; 7

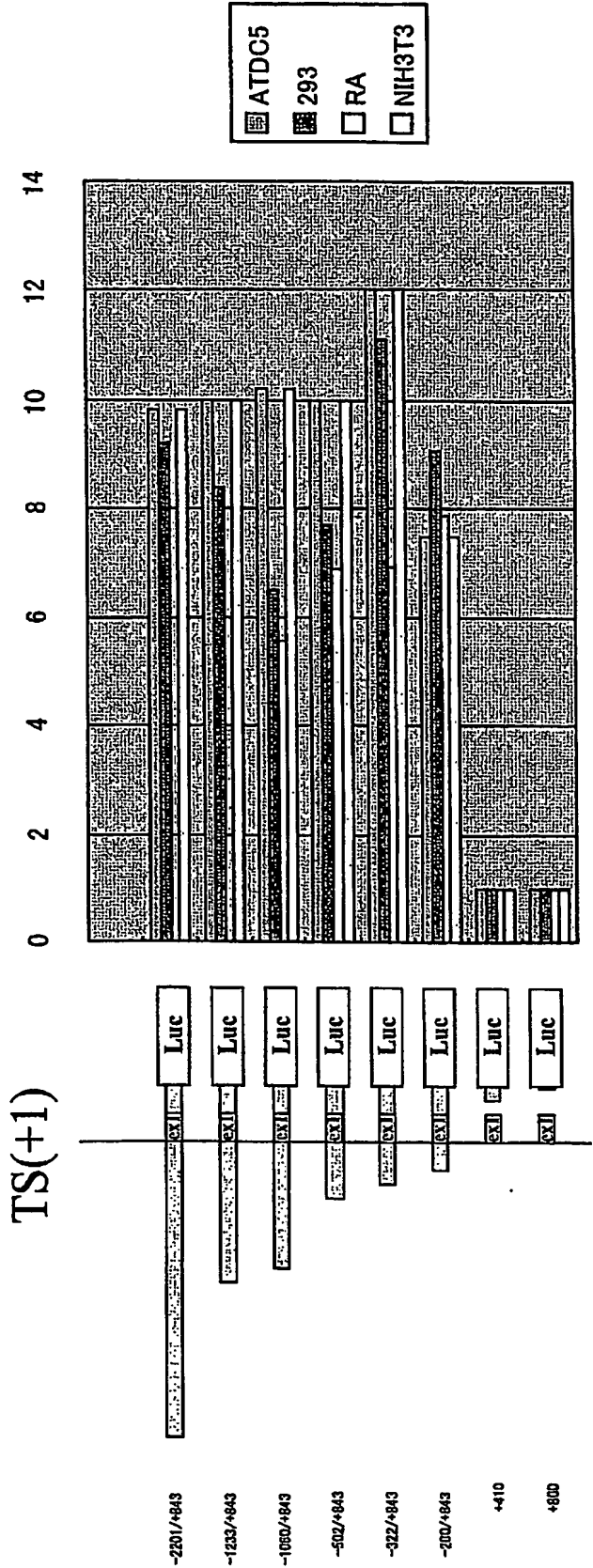
ccccgcgccg ccgtaagtgt

20



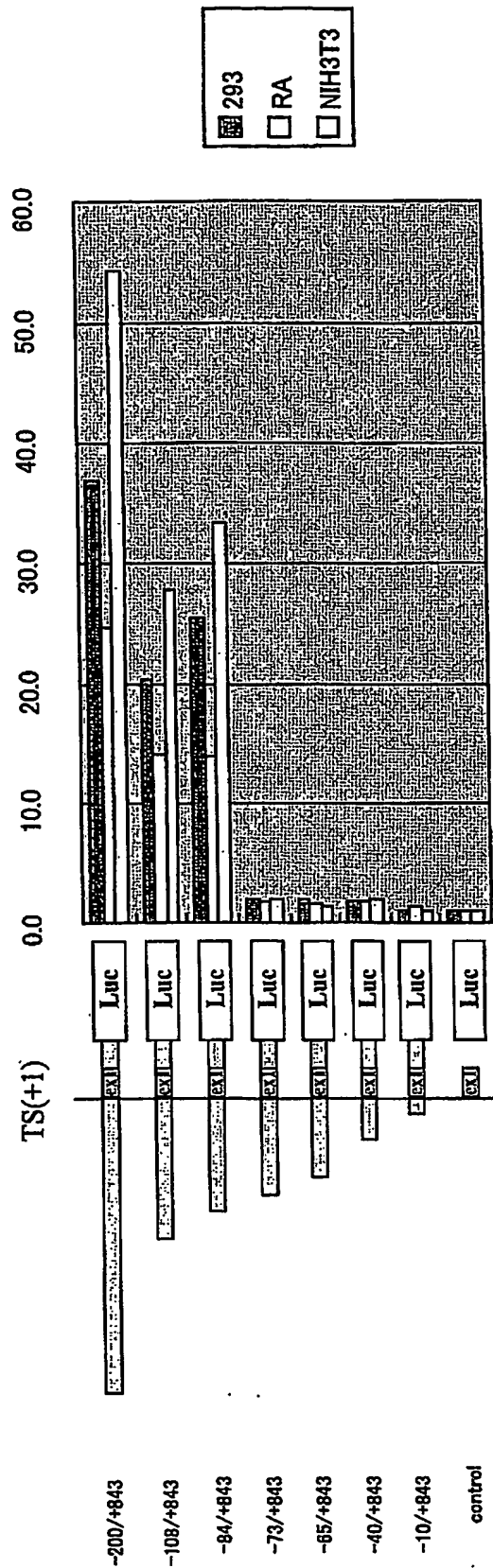
【書類名】 図面  
【図 1 a】

Relative Activity



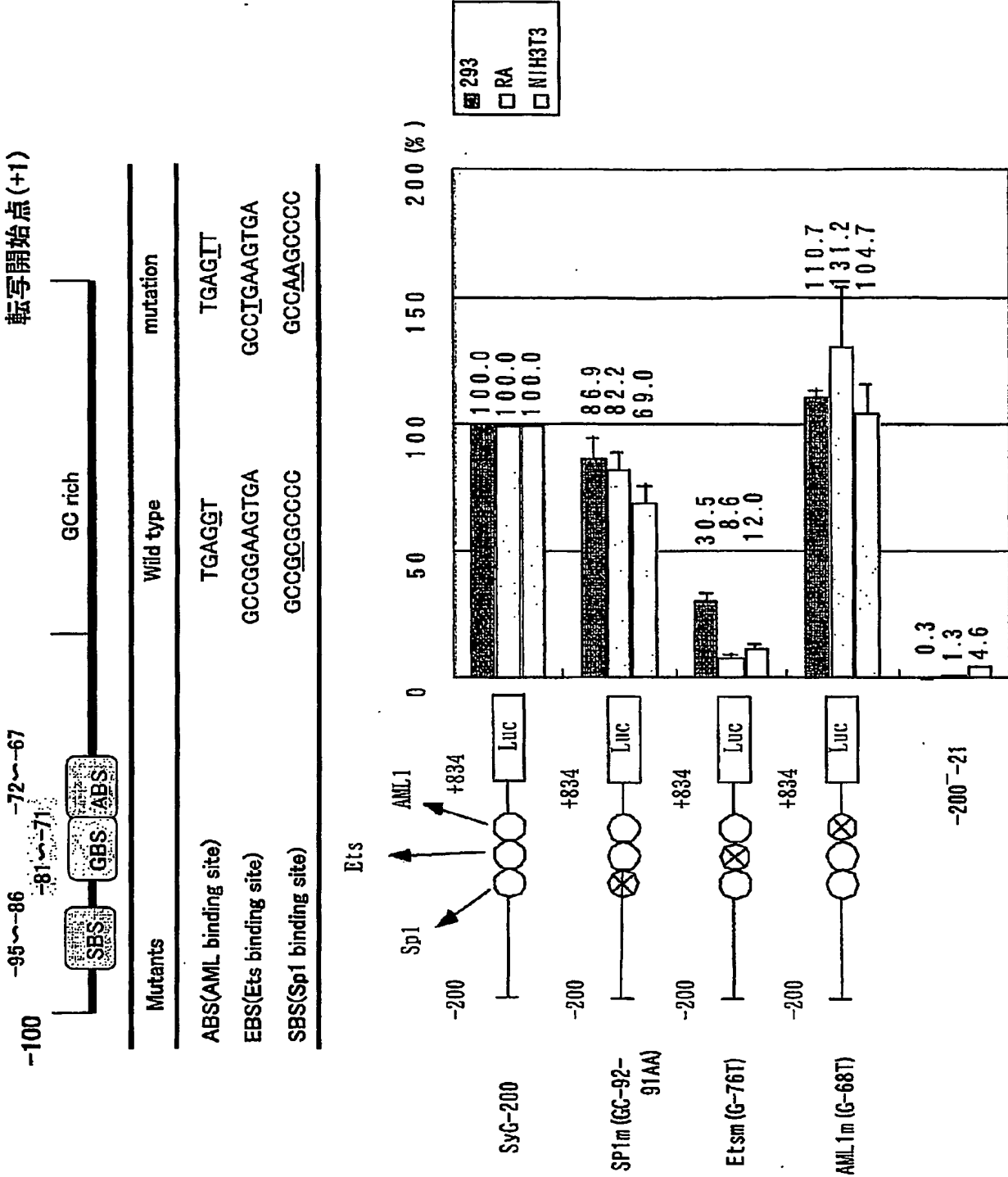
【図 1 b】

# Relative Activity

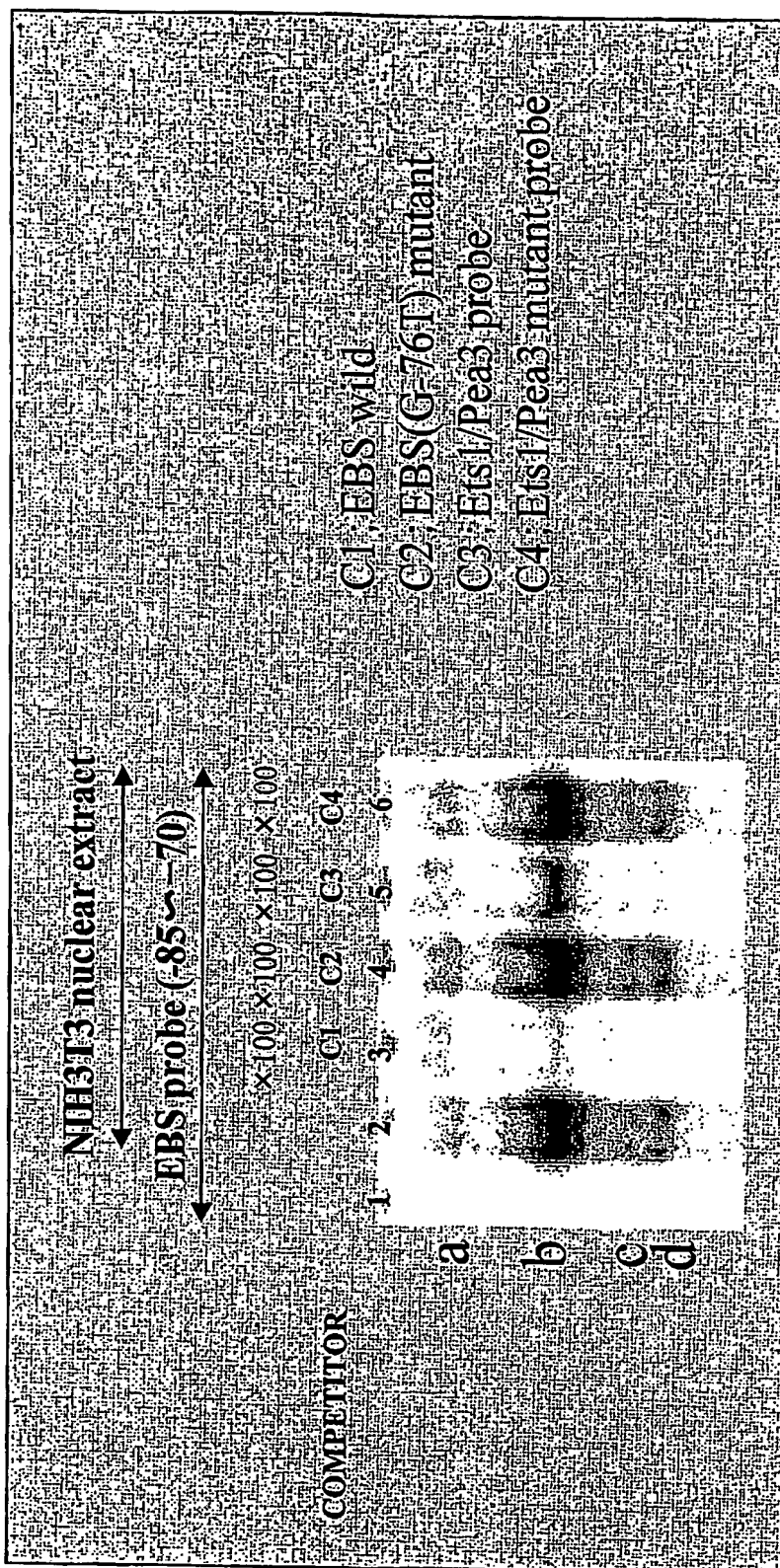




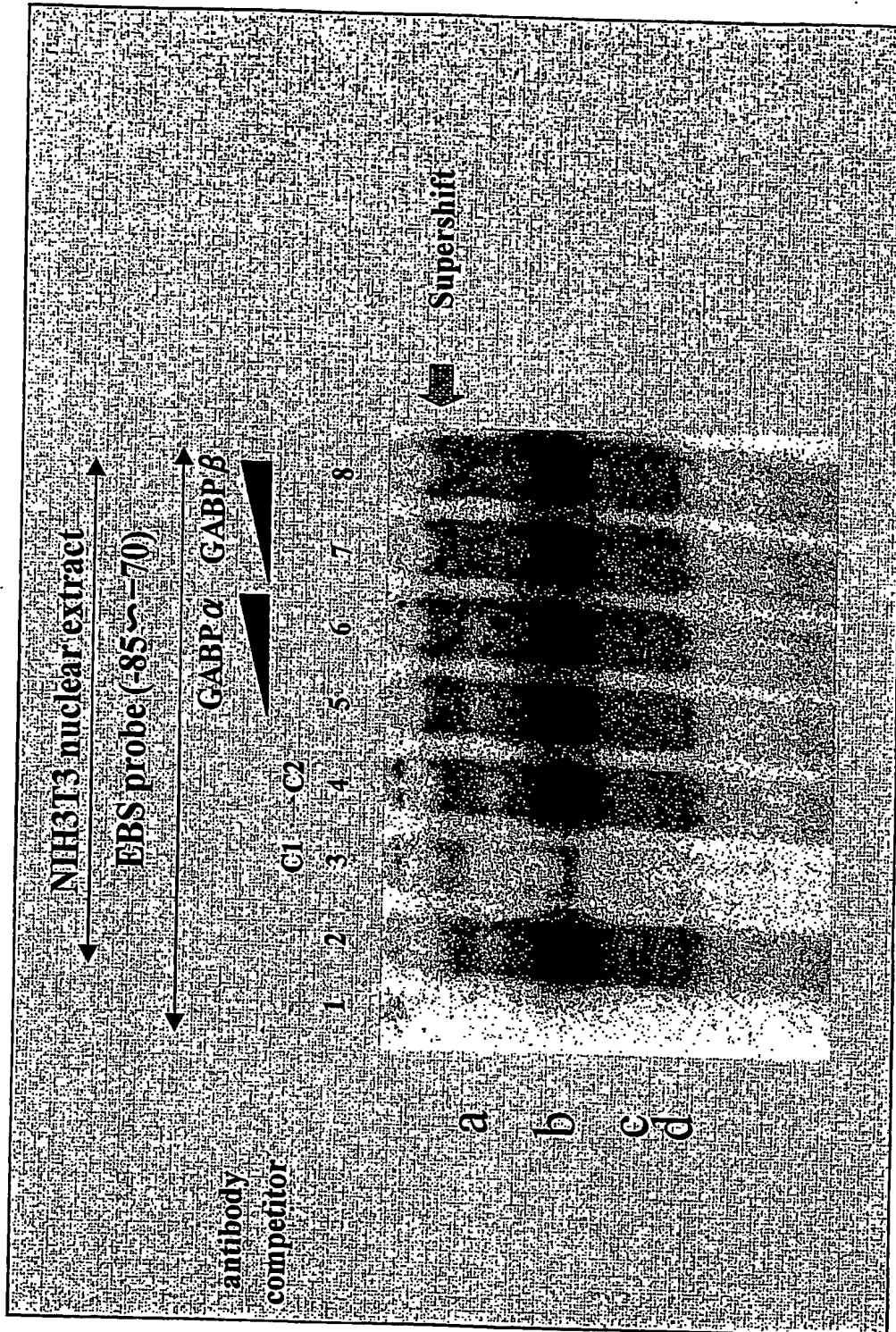
【図 1 d】



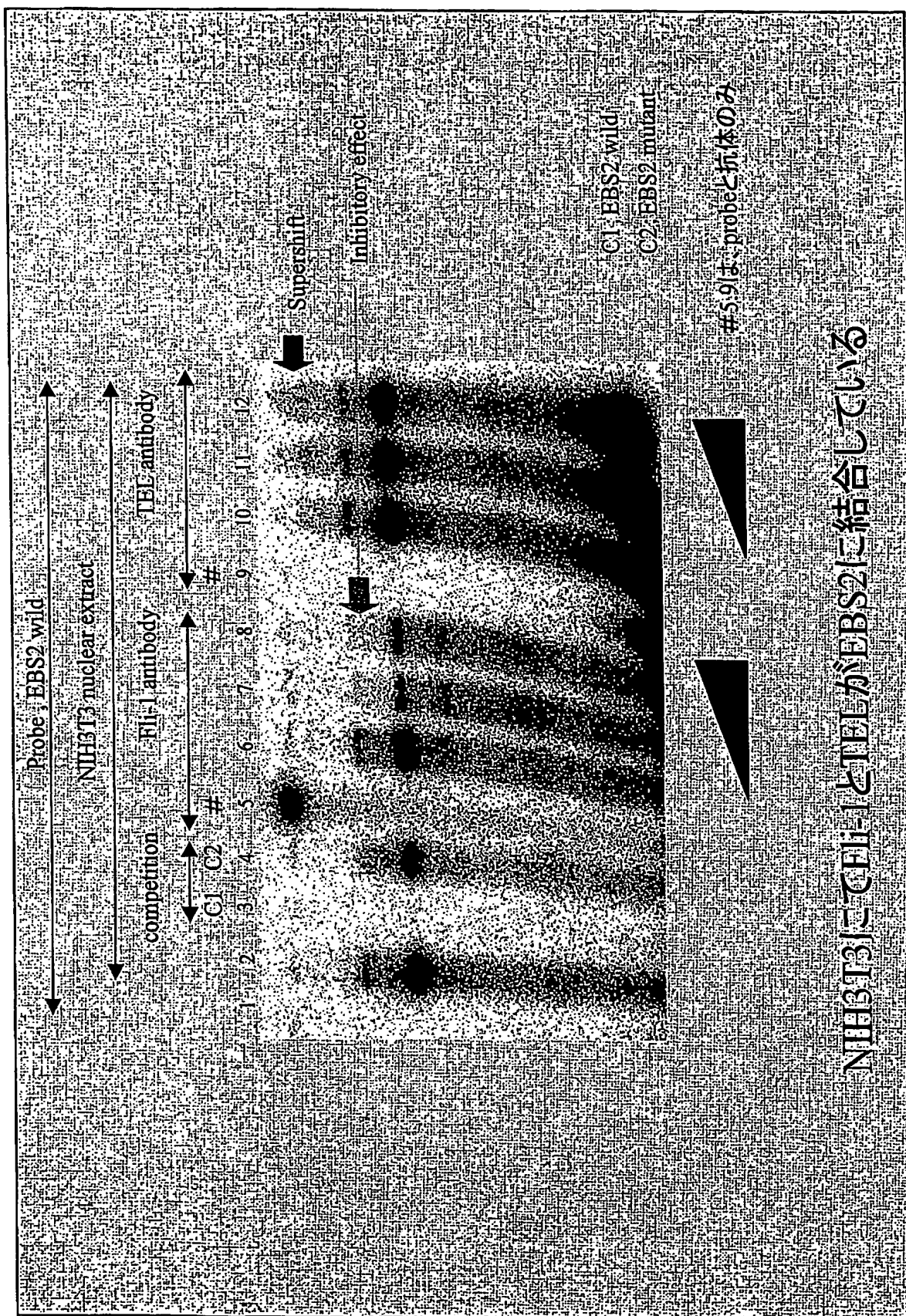
【図 2 a】



【図 2 b】

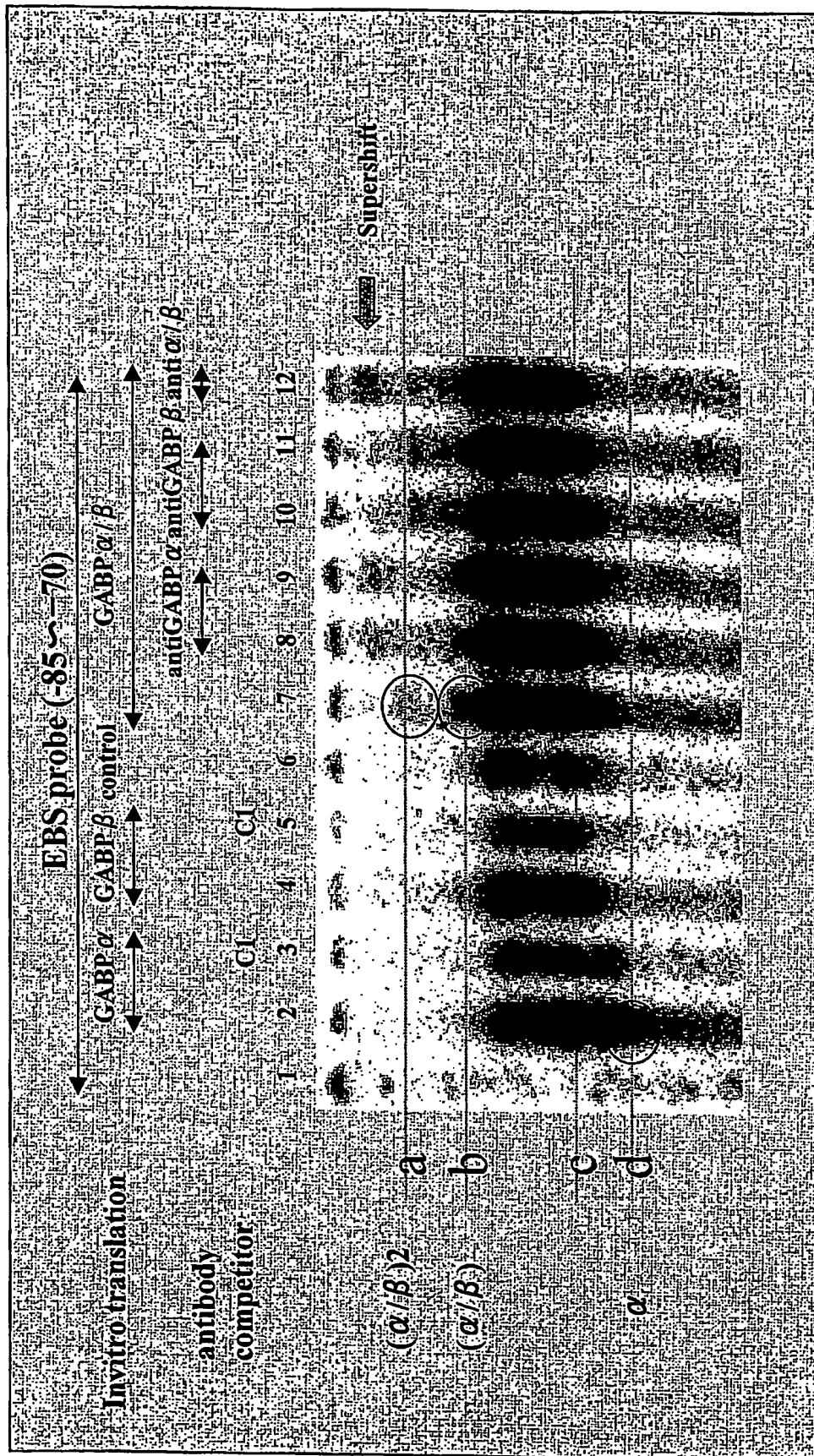


【図 2 c】



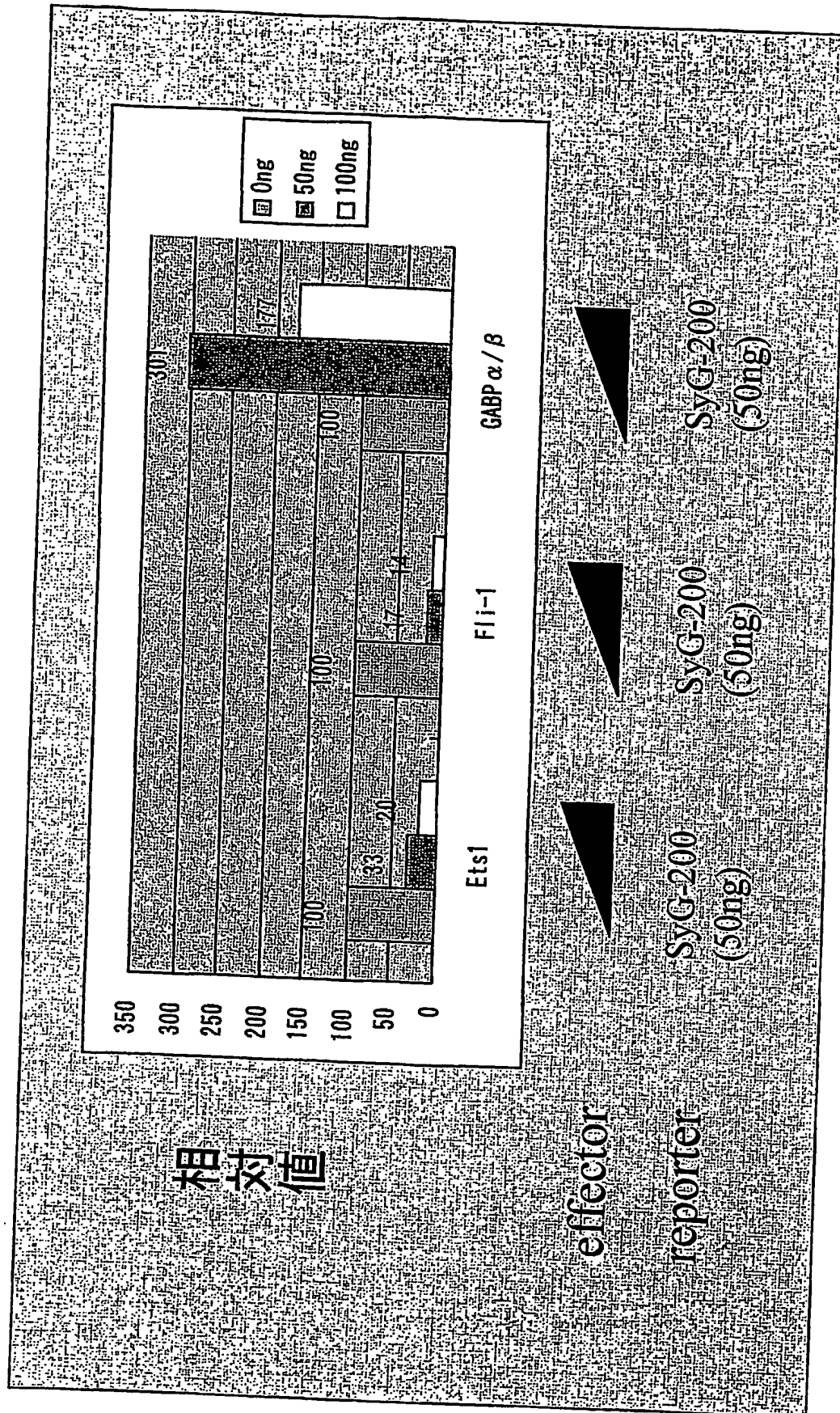


【図 2 d】

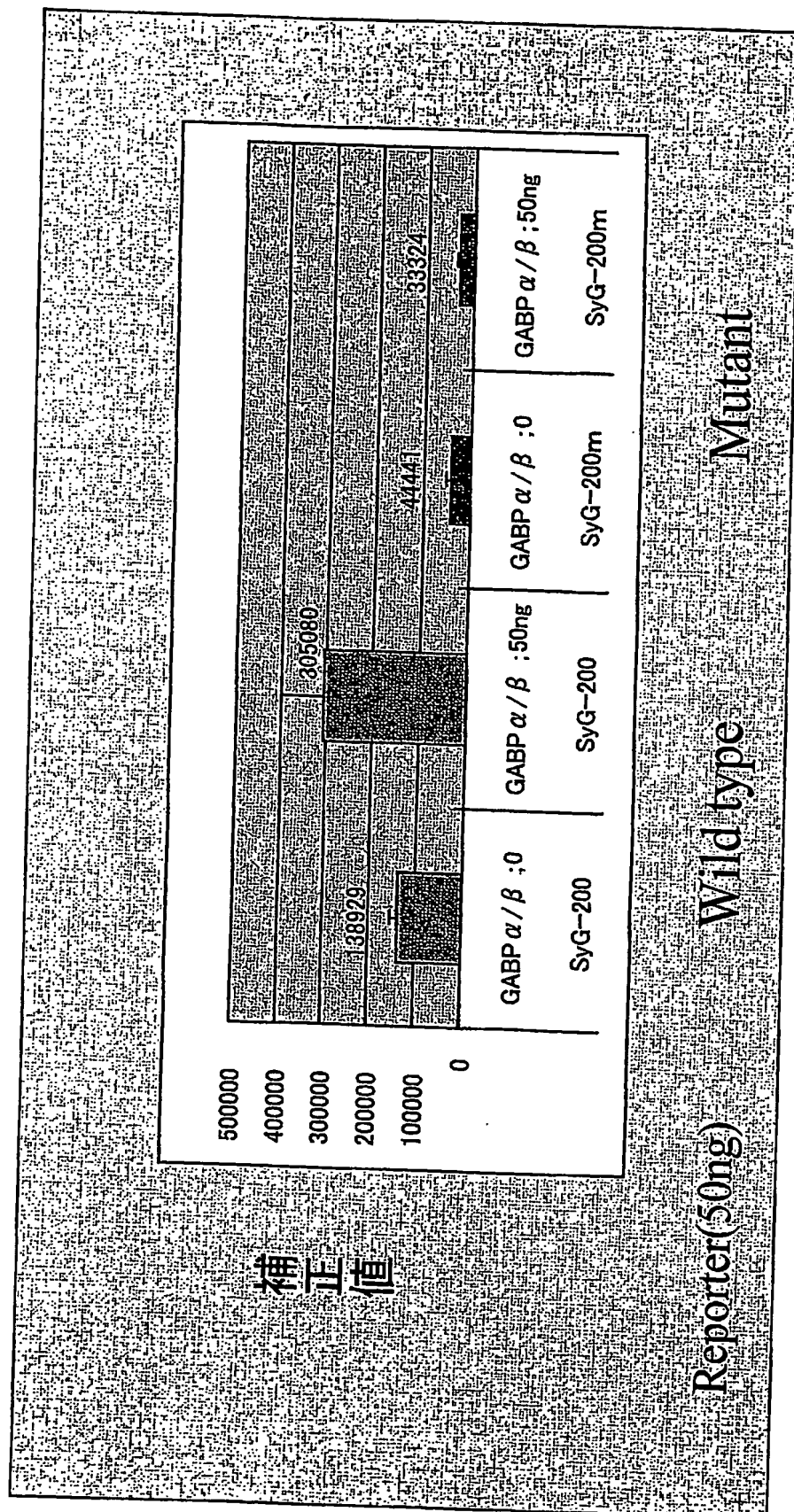




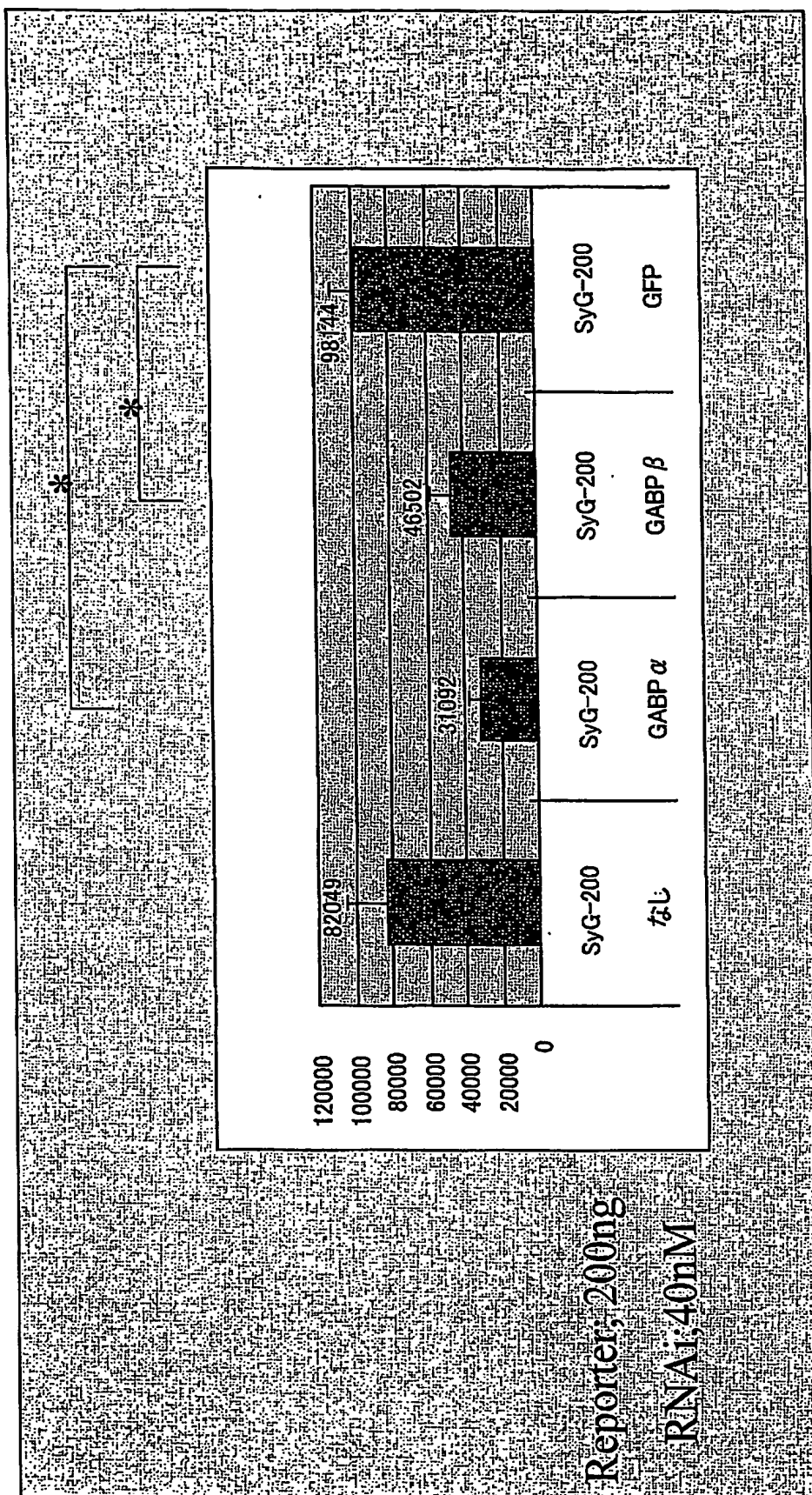
【図3a】



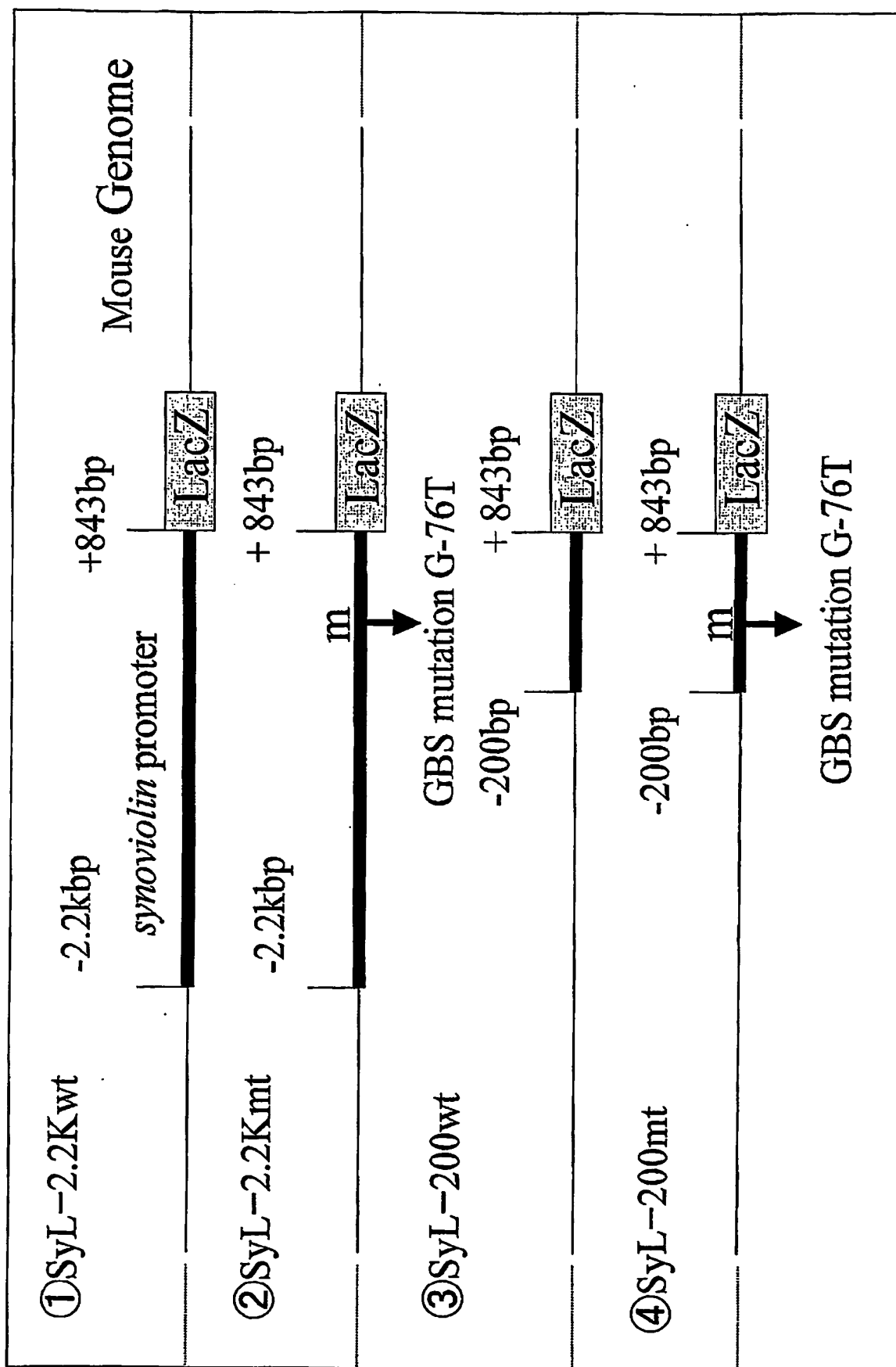
【図 3 b】



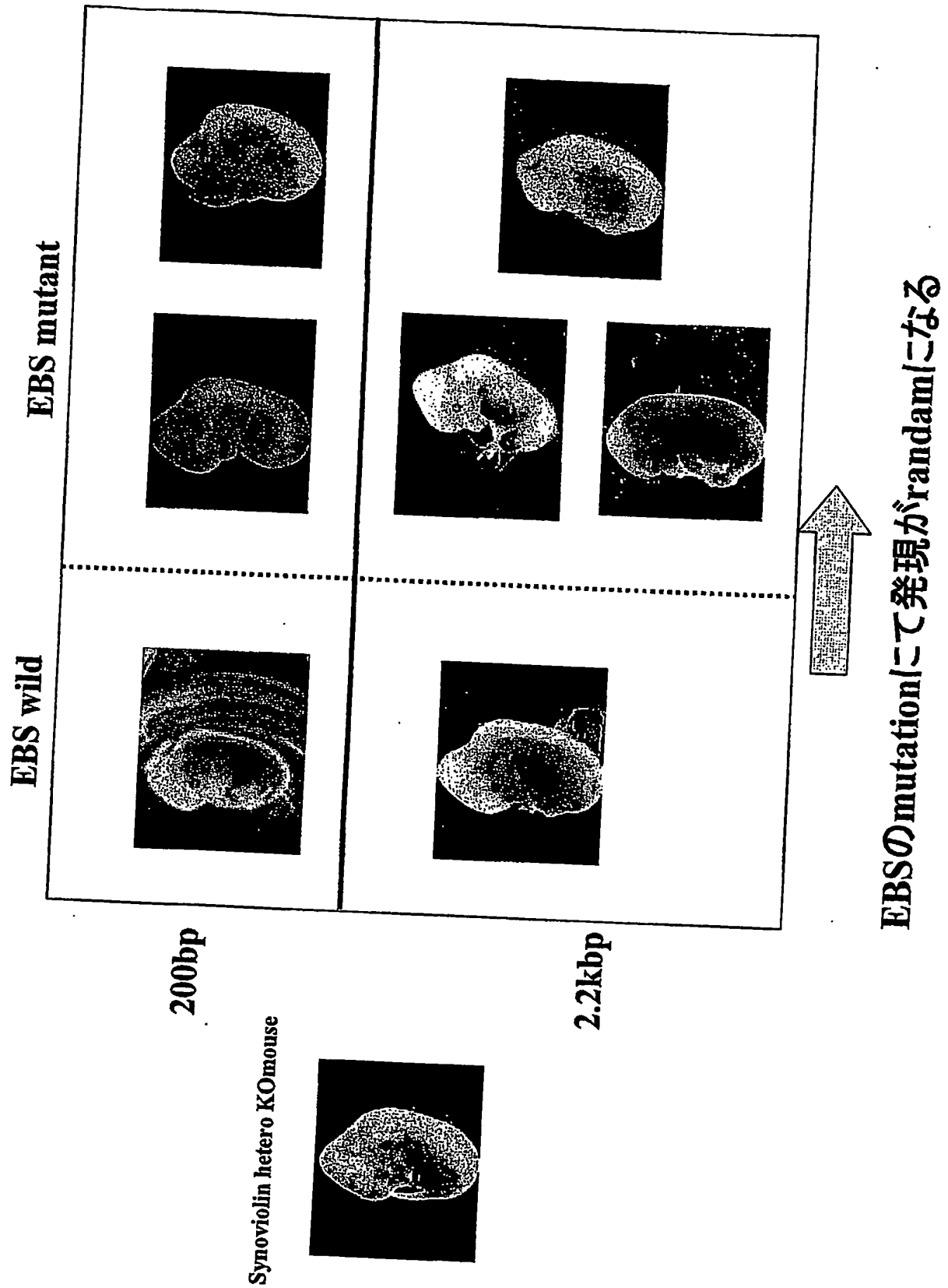
【図 3 c】



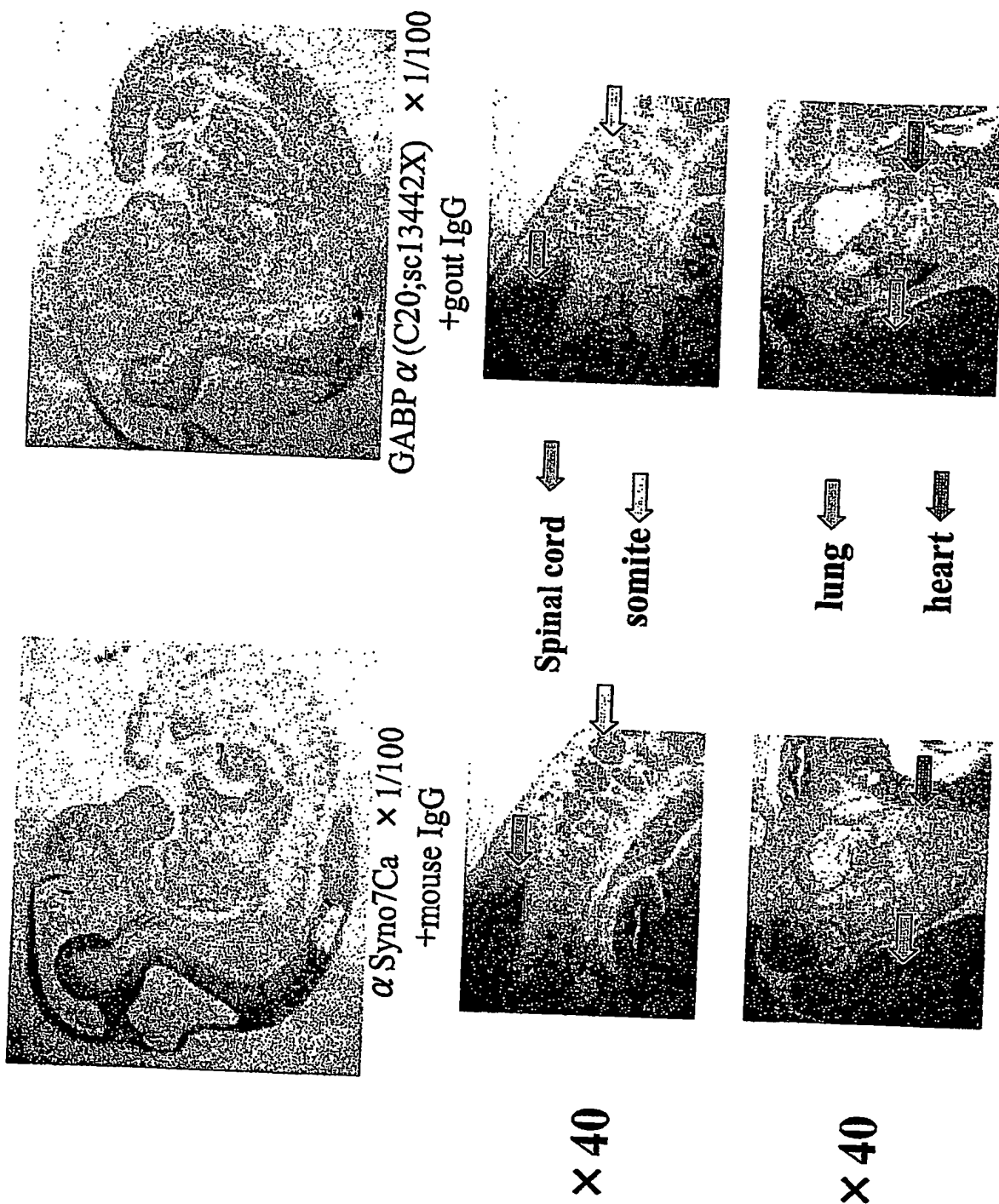
【図 4 a】



【図4b】

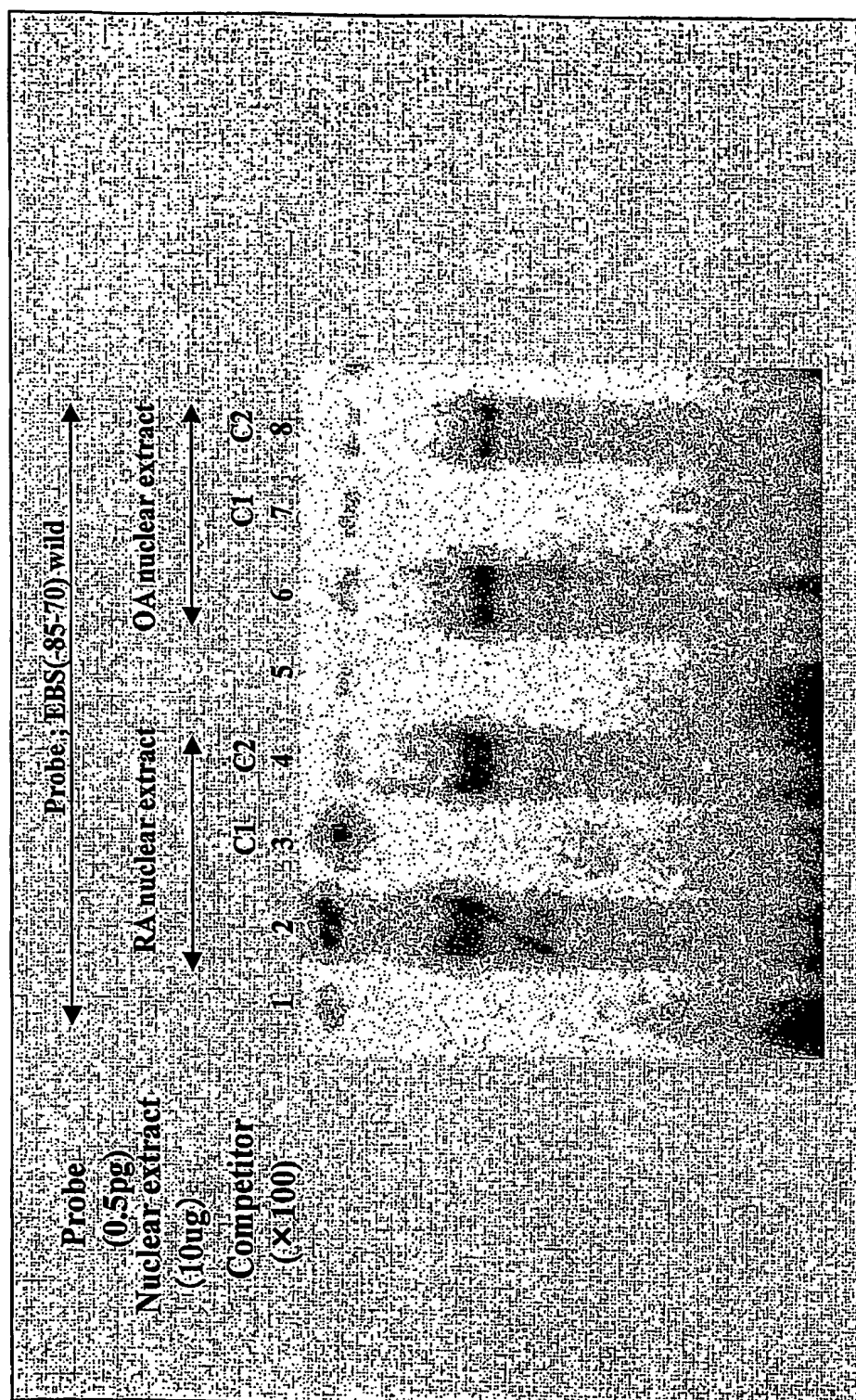


【図 4 c】



Synoviolin、GABP  $\alpha$  共にエビキタスの発現を認める

【図 5】





【書類名】要約書

【要約】

【課題】 シノビオリン遺伝子のプロモーター

【解決手段】 配列番号 1 若しくは 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 2120～2130 番目の塩基配列、又は配列番号 1 若しくは 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 1～2201 番目、969～2201 番目、1142～2201 番目、1699～2201 番目、1880～2201 番目、2002～2201 番目、2094～2201 番目若しくは 2118～2201 番目の領域の塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター、及び前記プロモーターの活性を阻害又は促進することを特徴とする、転写活性調節方法。

【選択図】 なし



特願 2003-297913

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [503302207]

1. 変更年月日 2004年 8月 6日
- [変更理由] 識別番号の二重登録による抹消
- [統合先識別番号] 301050902
- 住 所 東京都港区虎ノ門4-1-1 虎ノ門パストラル本館7階
- 氏 名 株式会社ロコモジェン

特願 2003-297913

出願人履歴情報

識別番号 [301050902]

1. 変更年月日 2004年 8月 6日  
 [変更理由] 住所変更  
 住 所 東京都港区虎ノ門4丁目1番地1号 虎ノ門パストラル本館  
 7階  
 氏 名 株式会社ロコモジェン
2. 変更年月日 2004年 8月 6日  
 [変更理由] 識別番号の二重登録による統合  
 [統合元識別番号] 503302207  
 住 所 東京都港区虎ノ門4丁目1番地1号 虎ノ門パストラル本館  
 7階  
 氏 名 株式会社ロコモジェン

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**